

Mathematische Modellierung der Dynamik von Lipidtropfen in
Leberzellen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach der Biophysik

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von Diplom-Ingenieurin Christin Wallstab

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Dr. h.c. Edda Klipp
 2. Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter
 3. Prof. Dr. Daniel Seehofer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 2017

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	II
II.	Abbildungsverzeichnis	V
III.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	IX
1	Zusammenfassung	1
2	Summary.....	2
3	Einleitung und Zielsetzung.....	3
4	Biologische Grundlagen.....	4
4.1	Lipidstoffwechsel der Leber	4
4.2	Intrazelluläre Lipidtropfen (lipid droplets).....	5
4.2.1	Struktur und Zusammensetzung von Lipidtropfen	5
4.2.2	Biogenese und Reifung von Lipidtropfen	6
4.2.3	Funktion von Lipidtropfen	8
4.3	LD-assoziierte Proteine.....	8
4.3.1	Perilipin.....	9
4.3.2	Adipophilin.....	9
4.3.3	Tip47	10
4.3.4	FSP27	10
4.4	Fettlebererkrankung.....	12
5	Experimentelle Untersuchungen	13
5.1	Dynamik von Lipidtropfen <i>in vitro</i>	13
5.1.1	Effekte der Oleatbehandlung auf die zeitabhängigen LD-Größenverteilungen in PLC-Zellen	13
5.1.2	Effekte der Oleatbehandlung auf die zeitabhängigen Lipidtropfenverteilungen in primären humanen Hepatozyten	17
6	Mathematische Modellierung	20
6.1	Modellbeschreibung.....	20
6.1.1	Regulatorische Oberflächenproteine und LD-assoziierte Enzyme.....	24
6.1.2	Hormonelle Regulation	25

6.2	Modellvalidierung und -parametrisierung.....	26
6.2.1	Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns des mikrosomalen Transferproteins (MTP)	30
6.2.2	Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns der Diacylglycerol Acetyltransferase1 und 2	31
6.2.3	Auswirkung des Knockdowns der PAT-Proteine	33
6.2.4	Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns von CGI-5.....	34
6.2.5	Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns von FSP27.....	35
6.2.6	Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns der HSL.....	36
6.2.7	Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns der ATGL	37
6.3	Modellanwendung.....	38
6.3.1	Quantifizierung der pro-steatotischen und anti-steatotischen Effekte individueller molekularer Prozesse	38
6.3.2	Änderung der Größenverteilungen von Lipidtropfen in TAG-akkumulierenden PLC- Zellen	39
6.3.3	Heterogenität der Größenverteilungen von Lipidtropfen in TAG-akkumulierenden primären humanen Hepatozyten	41
6.3.4	In-vivo-Dynamik von Lipidtropfen im Tagesverlauf	43
7	Diskussion und Schlussfolgerung.....	45
8	Literatur	52
9	Anhang	59
9.1	Material und Methoden.....	59
9.1.1	Material	59
9.1.2	Methoden.....	60
9.2	Auswertung experimenteller Daten.....	62
9.3	Ratengleichungen und stöchiometrische Matrix des Modells	70
9.3.1	Die Bindung von Fettsäuren an Albumin.....	70
9.3.2	Die Aufnahme von freien Fettsäuren durch Diffusion und einem aktiven Transportprozess mit CD36.....	71
9.3.3	Die Aktivierung von FFS durch Acyl-CoA-Synthetase.....	72
9.3.4	Die mitochondriale β -Oxidation durch Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1)	72
9.3.5	Die Triacylglycerolbiosynthese.....	73
9.3.6	Die Synthese von Lipidtropfen (ohne Proteinbesatz)	75
9.3.7	Die regulatorischen Oberflächenproteine (ROPs)	76

9.3.8 Die Degradation von LDs	78
9.3.9 Die Fusion von Lipidtropfen	79
9.3.10 Phospholipidsynthese durch Cholin-Phosphotransferase (CPT).....	80
9.3.11 Die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen.....	80
9.3.12 Stöchiometrische Matrix	81
9.4 Modellsimulationen	84
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation.....	88
Danksagung.....	89
Eidesstattliche Erklärung.....	90

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie eines Lipidtropfens (lipid droplet):.....	6
Abbildung 2: Prozesse der Bildung von Lipidtropfen.....	7
Abbildung 3: Prozesse des Wachstums von Lipidtropfen.....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Ursachen einer Fettleber.	12
Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopie „Live Cell Imaging“ von Lipidtropfen in PLC- Zellen	13
Abbildung 6: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung in PLC-Zellen.....	14
Abbildung 7: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von PLC-Zellen.....	15
Abbildung 8: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von PLC-Zellen.....	16
Abbildung 9: Quantifizierung des intrazellulären TAG-Gehalts einzelner PLC-Zellen	16
Abbildung 10: Phasenkontrastbilder von intrazellulären Lipidtropfen von primären humanen Hepatozyten	17
Abbildung 11: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von primären humanen Hepatozyten	18
Abbildung 12: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von primären humanen Hepatozyten	19
Abbildung 13: Schematische Darstellung der im Modell enthaltenen Prozesse.....	20
Abbildung 14: Mit Hilfe des Modells errechnete relative Besetzung der Lipidtropfenoberfläche durch ROPs als Funktion der LD-Größe.....	24
Abbildung 15: Vergleich von Modellsimulation mit experimentellen Daten von metabolischen Experimenten	27
Abbildung 16: Überexpression und Knockdown des mikrosomalen Transferproteins im stationären Zustand	30
Abbildung 17: Überexpression und Knockdown von DGAT1 im stationären Zustand	31
Abbildung 18: Überexpression und Knockdown von DGAT2 im stationären Zustand	32
Abbildung 19: Knockdown von ADRP im stationären Zustand	33
Abbildung 20: Knockdown von TIP47 im stationären Zustand.....	34
Abbildung 21: Knockdown und Überexpression von CGI-58 im stationären Zustand.....	34
Abbildung 22: Überexpression und Knockdown von FSP27 im stationären Zustand.....	36
Abbildung 23: Überexpression und Knockdown der hormon-sensitiven Lipase im stationären Zustand.....	36
Abbildung 24: Überexpression und Knockdown der ATGL im stationären Zustand.....	37
Abbildung 25: Relative Änderung des zellulären TAG-Gehalts durch die Änderung der maximalen Aktivität der individuellen Prozesse von $\pm 10\%$	38

Abbildung 26: Gemessene und simulierte LD-Größenverteilungen in PLC-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.....	40
Abbildung 27: Heterogenität des TAG-Levels und der LD-Größenverteilungen in einzelnen humanen Hepatozyten	42
Abbildung 28: Simuliertes Tagesprofil des TAG-Gehalts von Rattenhepatozyten in vivo	44
Abbildung 29: Beispiel für die Quantifizierung des Durchmessers von Lipidtropfen und des Zellkerns sowie der Fläche der Zelle mit der NIS-Elements-Software.	61
Abbildung 30: Quantifizierung der Lipidtropfenverteilungen in PLC-Zellen nach 24 h Verfettung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1).	62
Abbildung 31: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten.....	63
Abbildung 32: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten	63
Abbildung 33: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten	64
Abbildung 34: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten.....	64
Abbildung 35: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten	65
Abbildung 36: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten	65
Abbildung 37: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten.....	66
Abbildung 38: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten	66
Abbildung 39: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten	67
Abbildung 40: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten.....	67
Abbildung 41: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten	68
Abbildung 42: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten	68
Abbildung 43: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten	69
Abbildung 44: Quantifizierung der LD-Größenverteilungen in primären humanen Hepatozyten	69

Abbildung 45: Variation der freien Fettsäurekonzentration im Blutplasma von der totalen Fettsäurekonzentration.....	71
Abbildung 46: Überexpression und Knockdown von MTP im transienten Zustand (1h).	84
Abbildung 47: Überexpression und Knockdown von DGAT1 im transienten Zustand (1h).	84
Abbildung 48: Überexpression und Knockdown von DGAT2 im transienten Zustand (1h).	84
Abbildung 49: Knockdown von Perilipin im transienten Zustand (1h).	85
Abbildung 50: Knockdown von ADRP im transienten Zustand (1h).	85
Abbildung 51: Knockdown von TIP47 im transienten Zustand (1h).	85
Abbildung 52: Überexpression und Knockdown von CGI-58 im transienten Zustand (1h).	86
Abbildung 53: Überexpression und Knockdown von FSP27 im transienten Zustand (1h).	86
Abbildung 54: Überexpression und Knockdown der hormon-sensitiven Lipase im transienten Zustand (1h).	86
Abbildung 55: Überexpression und Knockdown der ATGL im transienten Zustand (1h)	87

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prognostizierte und beobachtete Änderungen von ausgewählten metabolischen Parametern der leberspezifischen Inhibition oder Aktivierung von regulatorischen Oberflächenproteinen und metabolischen Enzymen.	28
Tabelle 2: Dichten verschiedener Metabolite.....	70
Tabelle 3: Externe Bedingungen von stationären und transienten Simulationen.....	87

IV. Abkürzungsverzeichnis

ACoA	Acyl-CoA
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ADRP	Adipose differentiation-related Protein (Adipophilin)
AGPAT	Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
C	Cholesterol
CE	Cholesterolester
CPT-1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
CPT	Cholin-Phosphotransferase
DAG	Diacylglycerin
DGAT1	Diacylglycerin-Acyltransferase 1
DGAT2	Diacylglycerin-Acyltransferase 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFS	Freie Fettsäuren
G3P	Glycerin-3-Phosphat
GPAT	Glycerin-3-Phosphat Acyltransferase
HSL	Hormonsensitive Lipase
L	Lipidspezies
LD	Lipidtropfen
LPA	Lysophosphatidsäure
MAG	Monoacylglycerin
MGAT	Monoacylglycerin-Acyltransferase
MTP	Mikrosomales Transferprotein
NAFLD	Nicht alkoholische Fettlebererkrankung
NEFA	nicht veresterte Fettsäuren
PA	Phosphatidsäure
PAP	Phosphatidatphosphohydrolase

PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PLIN1	Perilipin
ROPs	Regulatorische Oberflächenproteine
TAG	Triacylglycerol
TIP47	Tail-interacting Protein 47
VLDL	Lipoproteine mit geringer Dichte (Very low density lipoprotein)

1 Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich mit der Dynamik von Lipidtropfen (lipid droplets, LD), intrazellulären Organellen, die der Speicherung von Lipiden (hauptsächlich Triacylglycerol, TAG) dienen. Das epidemische Auftreten von Fettleibigkeit (Adipositas) und der sogenannten Fettleber (Steatose) hat das wissenschaftliche Interesse an der Regulation der zellulären Speicherung in LDs stark beflügelt. Es gibt inzwischen zahlreiche Publikationen zu einzelnen Aspekten der Bildung, des Wachstums und des Abbaus von Lipidtropfen. Ein detailliertes mathematisches Modell, das diese Einzelergebnisse in ein konsistentes Bild zusammenfügt, gibt es allerdings nicht. Die Aufstellung, Validierung und Anwendung eines umfassenden mathematischen Modells der Dynamik von LDs steht daher im Mittelpunkt meiner Arbeit. Dieses Modell umfasst die Aufnahme von freien Fettsäuren aus dem Blutplasma, die Veresterung zu TAG, die Bildung, das Wachstum und die Lipolyse von Lipidtropfen (LDs), die durch etliche regulatorische Oberflächenproteine (ROPs) gesteuert werden. Außerdem werden der Aufbau und Export von Lipoproteinen mit geringer Dichte (VLDLs) sowie der Abbau von Fettsäuren in der β -Oxidation und der Umbau in der Phospholipidsynthese im Modell erfasst. Die Parametrisierung des Modells erfolgte für Rattenhepatozyten und basiert auf einer Rekapitulation von umfangreichen experimentellen Daten *in vitro* und *in vivo*. Für die Validierung des Modells wurden eigene experimentelle Untersuchungen von LD-Größenverteilungen in isolierten PLC-Zellen durchgeführt und Daten von primären humanen Hepatozyten quantifiziert. Eine mit Hilfe des Modells durchgeführte Kontrollanalyse zeigte auf, dass die Variation der Aktivität der Aufnahme von freien Fettsäuren (FFS), der Diacylglycerin-Acyltransferase 2 (DGAT2), des spezifischen Fusionsproteins (FSP27), Adipophilin (ADRP) und der adipozyten Triglyzeridlipase (ATGL) den stärksten Einfluss auf den zellulären TAG-Gehalt hatte. Eine wesentliche Frage im Zusammenhang mit der Entstehung einer Fettleber gilt den Mechanismen, die den heterogenen Fetteinlagerungen in der Leber zugrunde liegen. Eigene Experimente mit humanen Hepatomzellen (PLC) zeigten, dass eine Heterogenität in der TAG-Speicherung auch in isolierten Zellen existiert, wenn man sie einer Fettsäurebelastung unterwirft. Modellsimulationen zeigen, dass Schwankungen in der Expression zentraler regulatorischer Proteine bereits eine Heterogenität bis zu 50% erklären können. Unter der Annahme, dass eine solche Variabilität der Genexpression auch im intakten Organ vorliegt, prognostiziert das Modell eine Variation im TAG-Gehalt einzelner Zellen um einen Faktor drei bis sechs. Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Modellansatz zahlreiche experimentelle Ergebnisse von einzelnen Prozessen im zellulären TAG-Metabolismus und im Metabolismus der LD-Dynamik in ein konsistentes, neuartiges und dynamisches Modell eines metabolischen Netzwerks integriert. Ferner kann das Modell für Untersuchungen des Einflusses der Änderung von externen Bedingungen oder systematischen Parametern auf den TAG-Gehalt von Hepatozyten verwendet werden.

2 Summary

This dissertation occupies with the dynamic of lipid droplets, a cellular organelle, serving as lipid deposit transporting, mainly triacylglycerol (TAG). The epidemic occurrence of obesity and steatosis has inspired strongly the scientific interest in regulation of hepatic TAG accumulation in LDs. There are now numerous publications regarding individual aspects of formation, maturation and lipolysis of LDs. However, a detailed computational model putting together this fractional knowledge into a consistent unifying framework is lacking so far. In my thesis I focus on development, validation and implementation a comprehensive kinetic model encompassing the pathways of the fatty acid and triglyceride metabolism and the main molecular processes governing the dynamics of LDs. The dynamics of these organelles is controlled by a variety of *regulatory surface proteins* (RSPs). Assembly and export of VLDLs is mainly regulated by the microsomal transfer protein (MTP) and apo-protein B100. Formation and lipolysis of LDs is regulated by several RSPs of which the best studied belong to the PAT (Perilipin/Adipophilin/TIP47) and CIDE-Families. Parameterization of the model was performed to correctly recapitulate a large number of experimental *in vitro* and *in vivo* findings of rat hepatocytes. The model was validated by comparing computer simulations with a large set of independent experiments and own experiments with isolated PLC cells and primary human hepatocytes. A control analysis of the model revealed that variations in the activity of FFA uptake, diacylglycerol acyltransferase (DGAT)2, fat-specific protein 27 (FSP27), adipophilin (ADRP) and adipose triglyceride lipase (ATGL) have the strongest influence on the cellular TAG-Level. Experiments with primary human hepatocytes and human hepatoma cells (PLC) incubated with an excess of FFAs show a large heterogeneity of TAG content and LD size distribution. Intriguingly, a large cell-to-cell heterogeneity with respect to the number and size of LDs has been found in various cell types. These findings suggest that the extent of cellular lipid accumulation is not only determined by the imbalance between lipid supply and utilization but also by variations in the expression of RSPs and metabolic enzymes. To better understand the relative regulatory impact of individual processes involved in the cellular TAG turnover we varied randomly the expression of RSPs and metabolic enzymes. A random fold change by a factor of about two in the activity of RSPs was sufficient to reproduce the large diversity of droplet size distributions observed in individual cells. Under the premise that the same extent of variability of RSPs holds for the intact organ, our model predicts variations in the TAG content of individual hepatocytes by a factor of about three to six depending on the nutritional regime. Taken together, our modeling approach integrates numerous experimental findings on individual processes in the cellular TAG metabolism and LD dynamics metabolism to a consistent state-of-the-art dynamic network model that can be used to study how changes in the external conditions or systemic parameters will affect the TAG content of hepatocytes.

3 Einleitung und Zielsetzung

Die Leber ist das zentrale Organ der Lipogenese, Glukoneogenese und des Cholesterolfstoffwechsels. Zu den häufigsten Stoffwechselstörungen der Leber in den westlichen Industrieländern zählt die hepatozelluläre Steatose, die mit einem Lipid-Gehalt von über 5% des Lebergewichts definiert ist [1]. Bei dieser Störung im Stoffwechsel entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Lipid-Speicherung in Form von Lipidtropfen (lipid droplets) und Lipidfreisetzung. Bei der Speicherung von Lipiden werden Fettsäuren zu Triacylglycerol verestert und in Lipidtropfen verpackt. Damit schützen sich eukaryotische Zellen vor lipotoxischen Effekten der Fettsäuren [2]. Lipidtropfen sind zelluläre lipidspeichernde Liposomen, die mit regulatorischen Oberflächenproteinen (ROPs) assoziiert sind und aus einer ähnlichen molekularen Architektur wie die der Lipoproteine bestehen. Überwiegend sind Lipidtropfen in Adipozyten zu finden, wo ihre zentrale Funktion die Speicherung von Triacylglycerol im Fettgewebe des Körpers ist. Des Weiteren besitzen sie eine sehr hohe Dynamik in der Biogenese, Reifung und Degradation, die maßgeblich durch Oberflächenproteine reguliert wird. Eine Bildung von Lipidtropfen kann in wenigen Minuten als Antwort auf eine erhöhte Fettsäurekonzentration auftreten [3]. Außerdem können sich LDs über das Zytoskelett der Zelle mit Hilfe von SNARE Proteinen bewegen, um beispielsweise mit anderen LDs zu fusionieren [4, 5].

Aufgrund der klinischen Relevanz und Häufigkeit der Steatose war das Ziel dieser Arbeit die Dynamik der Lipidtropfenbiogenese experimentell *in vitro* und in einem kinetischen mathematischen Modell zu untersuchen. In humanen Hepatomzellen sollte die Dynamik der Lipidtropfen in Experimenten mit einer Fettsäurebelastung untersucht werden. Insbesondere sollte der Effekt der Verfettung auf die LD-Größenverteilungen von Lipidtropfen in einzelnen Hepatozyten untersucht werden. Das Wissen von zahlreichen experimentellen Studien über molekulare Mechanismen, die in der Dynamik von Lipidtropfen involviert sind, sollte mit einem mathematischen Modell in ein konsistentes Bild gebracht werden. Die Parametrisierung und Validierung des kinetischen Modells sollte auf zahlreichen Literaturdaten beruhen und die eigenen Untersuchungsergebnisse in Hepatozyten reproduzieren. Zudem sollte mit dem Modell betrachtet werden, unter welchen Bedingungen Lipidtropfen in Hepatozyten synthetisiert und degradiert werden und welchen Effekt die Zunahme von Fettsäuren im Blutplasma auf die Lipidtropfenverteilungen in der Leberzelle hat. Der regulatorische Einfluss von Oberflächenproteinen und Abweichungen von Proteinmengen auf die Größenverteilungen von Lipidtropfen und dem TAG-Gehalt eines Hepatozyten sollte untersucht werden, da diese zur Entwicklung einer Steatose führen kann. Diese Dissertation soll damit den Ansatzpunkt schaffen, zahlreiche experimentelle Ergebnisse der Lipidtropfenforschung und eigene experimentelle Ergebnisse besser in ein Gesamtbild zu überführen. Diese Arbeit soll helfen, Zielstrukturen für neue Medikamente zu finden und die Ergebnisse langfristig in der Behandlung von Steatose und Steatohepatitis nutzbar zu machen.

4 Biologische Grundlagen

4.1 Lipidstoffwechsel der Leber

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel, der unter anderem die Aufnahme, die Veresterung und die Oxidation von Fettsäuren umfasst. Zudem besitzt die Leber eine unbegrenzte Kapazität für den Transport von nicht veresterten freien Fettsäuren (NEFA) aus dem Blutplasma in die Zelle. NEFA werden über Albumin vom Fettgewebe zur Leber transportiert. Die Leber kann aber auch eigenständig freie Fettsäuren (FFS) über die De-Novo-Lipogenese herstellen. Weitere FFS Quellen der Leber sind die zytoplasmatischen Triacylglycerolspeicher und die Aufnahme von Triglyceriden durch Lipoproteine. Von welcher Quelle die Leber überwiegend FFS bezieht, hängt von den Spezies, der Ernährungssituation und der Energiebilanz ab.

In intrazellulären Lipidtropfen (LDs) kann die Leber veresterte Fettsäuren in Form von TAG-Speichern oder in der Lipoproteinsynthese TAG-reiche Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (VLDL) in das Blutplasma sezernieren. Der Transfer von TAG in die Lipoproteine schließt die Beteiligung von ApoB100 ein und wird durch das mikrosomale TAG-Transferprotein (MTP) katalysiert [6-8]. Neben der TAG-Synthese werden auch Fettsäuren in Form von DAG in der Phospholipidsynthese für den Membranaufbau verwendet.

Der TAG-Gehalt in der Leber wird durch die Aktivität von zellulären Molekülen reguliert, die sich beispielsweise auf die Lipolyse von Lipidtropfen auswirkt. Der Abbau von Lipidtropfen ist insulin- bzw. hormonabhängig. Eine der zwei wichtigsten Lipasen der Lipolyse ist die hormonsensitive Lipase (HSL), die durch Katecholamine stimuliert und durch Insulin über den cAMP-Signalweg inhibiert wird. Im Vergleich zur HSL ist die adipose Triacylglycerollipase (ATGL) im basalen Zustand wie auch nach der hormonellen Stimulation mit der Oberfläche von Lipidtropfen assoziiert [9]. Im basalen Zustand ist der Koaktivator *comparative gene identification protein* 58 (CGI58) mit Perilipin auf der Lipidtropfenoberfläche assoziiert. Durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A bindet CGI58 die ATGL und erhöht deren Lipolyseaktivität [10]. Reid et al. konnten bei einer adenoviralen Überexpression der HSL und/oder der ATGL eine 40-60%ige Reduktion des TAG-Gehalts der Leber in *ob/ob* Mäusen und in Mäusen mit Übergewicht feststellen, das durch fettreiche Ernährung induziert war [11]. Die ATGL wurde überwiegend in Adipozyten untersucht und hydrolysiert ebenfalls TAG und DAG zu FFSs in Hepatozyten. Die freigesetzten FFSs werden daraufhin entweder nochmals verestert oder in der β -Oxidation oxidiert. Über den Membrantransporter CPT-1 gelangen aktivierte Fettsäuren in die Mitochondrien. Dieser Prozess ist der ratenlimitierende Schritt der β -Oxidation und kann durch die Interaktion mit Malonyl-CoA inhibiert werden. Über Malonyl-CoA erhöht die Leber im Hungerzustand die β -Oxidation zur Energiebereitstellung oder senkt diese in einem ernährungsreichen Zustand.

Der Lipidstoffwechsel wird neben der hormonellen Regulation auch von Fettsäuren reguliert, die die Genexpression über nukleäre Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren kontrollieren [12]. Unter anderem hat man entdeckt, dass die Genexpression von Transkriptionsfaktoren wie z.B. peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α , β and γ), SREBP-1c und retinoid X receptor (RXRa) durch Fettsäuren reguliert werden [13-15]. Durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit Signalmolekülen verschiedener Stoffwechselwege wird die Aktivität zahlreicher Enzyme koordiniert, die in den Lipidstoffwechsel involviert sind und Fettsäuren bzw. Energie der Leber bereitstellen.

Die einzelnen detaillierten Syntheseschritte des Lipidmetabolismus werden im Abschnitt 6.1 Modellbeschreibung näher erklärt und bildlich dargestellt.

4.2 Intrazelluläre Lipidtropfen (lipid droplets)

Die Fähigkeit freie Fettsäuren in Triacylglycerole (TAG) zu synthetisieren und diese in intrazelluläre Lipidtropfen zu speichern, ist ein universelles Merkmal von Eukaryoten. Lipidtropfen sind dynamische Zellorganellen deren Auf- und Abbau hormonell reguliert wird [16]. Bei einem Überangebot an freien Fettsäuren kann besonders das Fettgewebe große Mengen an TAG in Form von einzelnen großen Lipidtropfen speichern und bei Bedarf wieder bereitstellen. Die Überschreitung der zellulären Speicherkapazität kann hingegen eine Gewebeschädigung durch bioaktive Lipide verursachen, das vor allem bei Stoffwechselstörungen beobachtet wurde [17]. Im Jahre 1991 identifizierten Constantine Londos und seine Mitarbeiter in einer wegweisenden Arbeit das Protein Perilipin, welches mit der Oberfläche von Lipidtropfen in Adipozyten assoziiert war und einen starken Einfluss auf die Speicherung von Lipiden in Lipidtropfen hatte [18]. Ab diesem Moment gewannen die Forschung der Regulation intrazellulärer Lipidtropfen und lipid-assoziiierter Erkrankungen zunehmend an Bedeutung und steigende klinische Relevanz.

4.2.1 Struktur und Zusammensetzung von Lipidtropfen

Lipidtropfen setzen sich aus einem neutrallipidreichen Kern, der überwiegend aus Triacylglycerolen und Cholesterolestern (CE) besteht und einer einlagigen Phospholipidschicht zusammen, die den hydrophoben Kern ummantelt und mit amphiphilen Oberflächenproteinen assoziiert ist (Abbildung 1). Jedem Lipidtropfen ist eine spezifische Proteinzusammensetzung gemäß dem Zelltyp und des metabolischen Zustandes gegeben [19]. Ebenfalls setzt sich die Phospholipid-Einzelschicht abhängig vom Zelltyp aus verschiedenen polaren Lipiden zusammen. So wurden in CHO-Zellen 160 unterschiedliche Phospholipid-Spezies entdeckt, die in den Kopfgruppen und Seitenketten variieren [20]. In Lipidtropfen von Säugetieren ist Phosphatidylcholin (PC) das Hauptoberflächenphospholipid neben Phosphatidylethanolamin (PE) and Phosphatidylinositol [20].

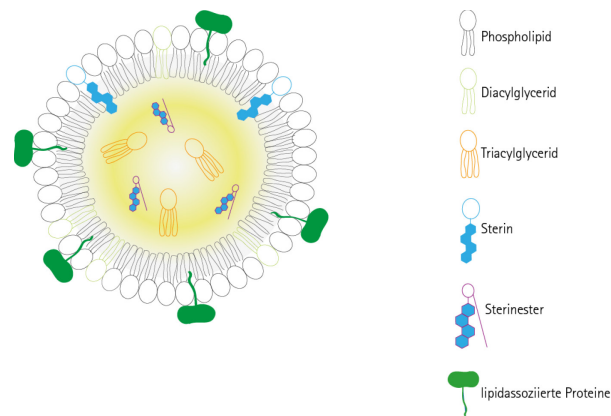


Abbildung 1: Morphologie eines Lipidtropfens (lipid droplet): Die Phospholipid-Einzelschicht ummantelt den neutrallipidreichen Kern und ist mit amphiphilen Proteinen assoziiert.

4.2.2 Biogenese und Reifung von Lipidtropfen

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Lipiden assimiliert das von DGAT1 bzw. DGAT2 neu synthetisiertes TAG bis zu wenige mol % in dER-Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) [21, 22] (Abbildung 2 (a)). Wenn TAG die Löslichkeitsgrenze der Phospholipidschicht überschreitet, wird es zwischen beiden ER-Membranen sequestriert (Abbildung 2 (b)). Es bildet sich ein sogenanntes linsenförmiges Aggregat aus TAG, wie in einem experimentellen und auch in einem theoretischen Modell gezeigt wurde [23, 24]. Dennoch ist noch unklar, ob dieser Prozess aufgrund der Lipideigenschaften oder protein-spezifisch reguliert wird. Bei der Entstehung eines Lipidtropfens sondert sich womöglich das linsenförmige Aggregat mit einer Phospholipidschicht von der ER-Membran ab. Auch dieser Prozess ist ungeklärt und wird mit folgender Hypothese versucht zu erklären (Abbildung 2):

- Knospung des „nascent LD“ von der Phospholipidschicht der zytoplasmatischen ER-Membran [25] mit (c1-c2) oder ohne Oberflächenproteinbesatz (d1)
- die Oberflächenproteine assoziieren erst nach der Knospung mit den Lipidtropfen (d2)

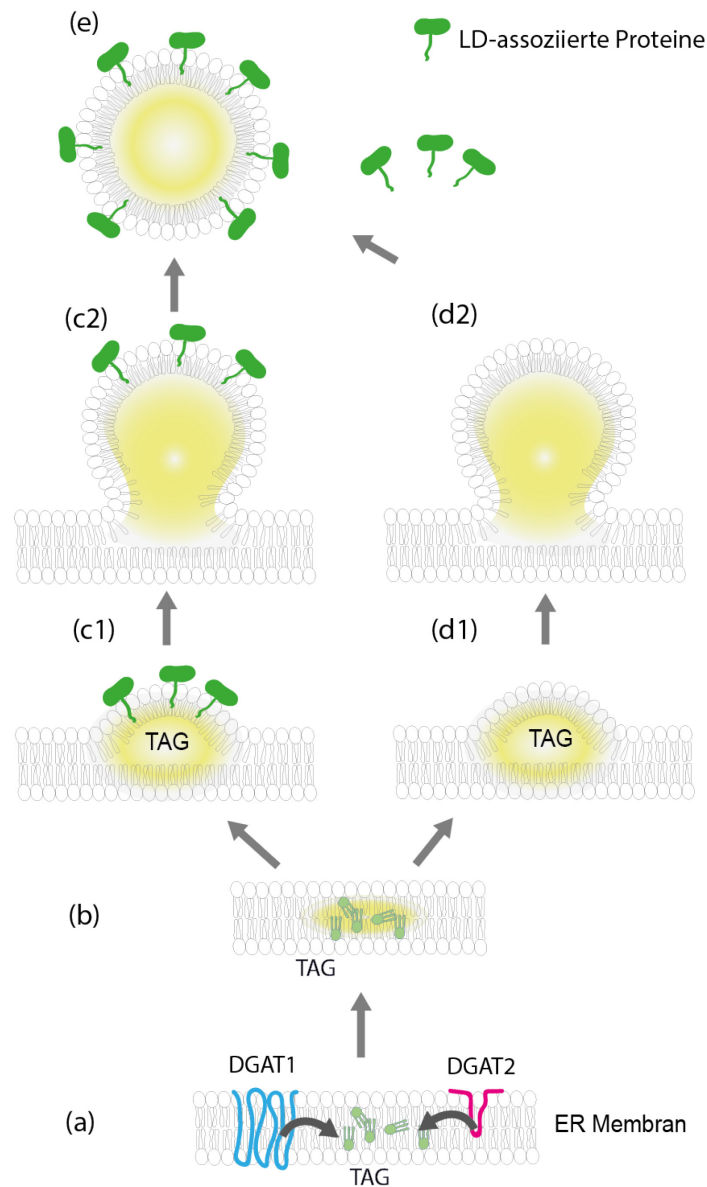


Abbildung 2: Prozesse der Bildung von Lipidtropfen

Zanghellini et al. konnten mit einem mathematischen Modell zeigen, dass sich Lipidtropfen mit einem Durchmesser ab 12 nm aus der Membran mit inhomogener Phospholipidverteilung abspalten [26].

Die weitere Reifung bzw. das Wachstum von Lipidtropfen wird womöglich durch drei unterschiedliche Mechanismen ermöglicht (Abbildung 3):

- Fusion von zwei Lipidtropfen [27, 28]
- TAG-Transfer zwischen zwei unterschiedlich großen Lipidtropfen durch Bindung von Perilipin und FSP27 [27, 28]
- Auffüllung durch direkte Lipidsynthese mit Transmembranprotein DGAT2 [29]

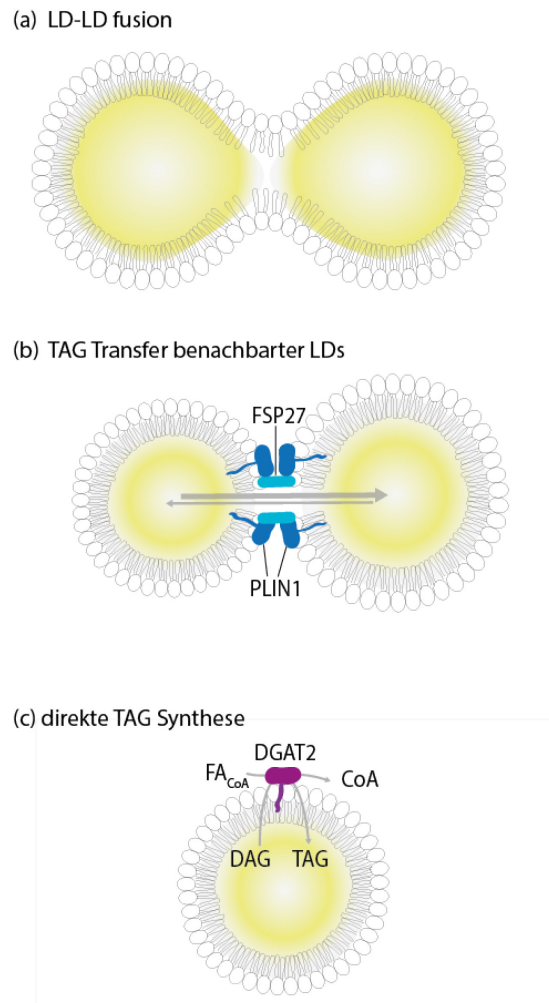


Abbildung 3: Prozesse des Wachstums von Lipidtropfen

4.2.3 Funktion von Lipidtropfen

Die zentrale Funktion von Lipidtropfen ist die Speicherung von TAG und CE, wenn die Synthese und/oder die Aufnahme von FFS und Cholesterin den zellulären Bedarf und die Freisetzung von Lipiden durch die Lipoproteine übersteigen. Die im Lipidtropfen gespeicherten Lipide werden nach Bedarf für Stoffwechsel, Membran- und Steroidsynthese mobilisiert [30]. Zudem sind Lipidtropfen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an der Proteindegradation [31, 32], an der Antwort auf ER-Stress [33], der Proteinglykosylierung [34] und bei pathogenen Infektionen beteiligt [35].

4.3 LD-assozierte Proteine

Lipidtropfen in unterschiedlichen Zelltypen besitzen einen spezifischen Oberflächenproteinbesatz [36]. Die PAT-Proteinfamilie, zu denen Perilipin (PLIN1), Adipophilin (ADRP) und „tail-interacting“ Protein 47 kDA gehören, sind die am besten untersuchten LD-assozierten Proteine [18, 37, 38]. Die PAT-Proteine sind mit der Oberfläche von Lipidtropfen assoziiert. Die ersten Hinweise, dass Proteine an die Oberfläche von

Lipidtropfen binden und einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Lipidmetabolismus haben, gab es durch die Entdeckung von Perilipin auf Lipidtropfen in Adipozyten 1991 im Labor von Constantine Londos [18]. Danach wurden weitere LD-assoziierte Proteine mit hoher Sequenzhomologie zu Perilipin entdeckt, unter anderem ADRP, Tip47, S3-12 und OXPAT. Diese umfangreich untersuchten LD-assoziierten Proteine stellen aber nur einen kleinen Teil der zahlreichen entdeckten Oberflächenproteine von Lipidtropfen dar [39]. Eine weitere Familie der Oberflächenproteine von LDs sind die CIDE-Proteine (cell death-inducing DFF45-like effector), die ebenfalls eine wichtige Funktion in der Morphologie von LDs in Hepatozyten und Adipozyten besitzen [28, 40]. In dieser Arbeit werden aufgrund der Vielzahl an LD-assoziierten Proteinen demnach nur die Proteine untersucht, zu deren möglicher Funktion experimentelle Untersuchungen vorliegen.

4.3.1 Perilipin

Perilipin wird überwiegend in Adipozyten synthetisiert und kontrolliert die Lipolyse [18]. Neben der Expression von Perilipin in Adipozyten wurde ebenfalls die Expression in steatotischen Hepatozyten nachgewiesen [19, 36, 41, 42]. Die Expression des Perilipin-Gens wird im Wesentlichen durch den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ (PPAR γ) reguliert [43, 44]. Im basalen Zustand ist die Hauptfunktion von Perilipin den Zugang von Lipasen zu Lipiden im LD zu verhindern und die Hydrolyse von TAG zu verringern [45, 46]. Takahashi konnte zeigen, dass sich zeitgleich mit dem Anstieg der Menge an gespeichertem TAG die Expression von Perilipin erhöhte [47]. Im phosphorylierten Zustand unterstützt Perilipin aktiv die Lipaseaktivität durch die Rekrutierung der HSL zur Lipidtropfenoberfläche [48, 49]. Eine weitere Interaktion von Perilipin wurde mit CIDE-C (cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor 45-like effector) bei der Lipidtropfenfusion beobachtet [27]. Darüber hinaus interagiert Perilipin ebenfalls mit anderen Proteinen, die für die Regulation der Lipolyse entscheidend und vom Phosphorylierungszustand von Perilipin abhängig sind (siehe Abschnitt 4.1).

Eine signifikante Expression von Perilipin konnte aber in einer gesunden Leber nicht nachgewiesen werden. In Untersuchungen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskop wurde Perilipin aber in humanen Leberparenchymverfettungen beobachtet, in denen Perilipin bevorzugt mit großen Lipidtropfen assoziierte und große LDs vorwiegend perizentral lokalisiert waren [19].

4.3.2 Adipophilin

Das Protein *adipose differentiation-related protein* (ADRP) wurde 1992 zum ersten Mal in der Differenzierungsphase von Präadipozyten entdeckt [50]. Es ist ~50 kDa schwer und wird ubiquitär exprimiert [51, 52]. Adipophilin bindet an die Membran bzw. an die Oberfläche von Lipidtropfen [51, 52]. 1996 fanden Steiner et al. bei der Behandlung von Rattenlebern mit Etomoxir, einem Inhibitor der Carnithin Palmitoyltransferase 1, eine Korrelation zwischen

Lipidakkumulation und der Menge von ADRP heraus [53]. Im Vergleich zu Perilipin bindet ADRP auch an kleinere Lipidtropfen in Adipozyten und kann in Perilipin-null-Mäusen Perilipin bei der TAG-Speicherung funktionell ersetzen [49]. In Hepatozyten wird die Expression überwiegend über PPAR α reguliert [54, 55]. Die Überexpression von ADRP ist assoziiert mit der Entwicklung von LDs und der Erhöhung der zellulären TAG-Menge, wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde [56, 57]. Im Vergleich dazu verhindert die gezielte Deletion von ADRP die Entwicklung einer Fettleber in Mäusen [58]. Bei der Reduzierung der Menge von ADRP wurde in murinen Fibroblasten und AML12-Zellen eine Kompensation durch Tip47 beobachtet [59, 60]. Die Verteilung und die Größe der Lipidtropfen änderten sich erst nachdem die Menge beider Oberflächenproteine ADRP und Tip47 reduziert wurde [60]. Der Durchmesser und die lipolytische Aktivität nahmen in murinen AML12-Zellen zu.

4.3.3 Tip47

Tip47 („tail-interacting protein of 47 kDa“) wurde im Vergleich zu Adipophilin und Perilipin nicht nur an der Oberfläche von LDs lokalisiert, sondern auch an verschiedenen Stellen innerhalb der Zelle, z.B. im Cytosol [61]. Zum ersten Mal wurde es 1998 durch die Interaktion mit dem Mannose-6-phosphat-Rezeptor isoliert. Diaz und Pfeffer vermuteten eine direkte Wirkung von Tip47 auf den Transport des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors von Endosomen zum trans-Golgi-Apparat, welches aber Medigeschi and Schu 2003 in Experimenten mit Mäusefibroblasten widerlegten [30, 62].

Tip47 ist ein mit Lipidtropfen assoziiertes Protein und reiht sich durch seine hohe Sequenzhomologie zu Perilipin und Adipophilin in die Familie der PAT-Proteine ein. Es ist wahrscheinlich bei der Biogenese von Lipidtropfen beteiligt und assoziiert mit sehr kleinen Lipidtropfen in Zellen, die mit Ölsäure inkubiert wurden [36]. Im Vergleich zu Perilipin und ADRP ist Tip47 im Zytosol stabil und assoziiert mit Lipidtropfen als Antwort auf eine Fettsäurebelastung in Mäuselebern. Bei der Reduzierung von Tip47 in AML12-Zellen war im Vergleich zur Kontrolle keine Änderung in der Größe und der Anzahl an Lipidtropfen zu beobachten [60]. Bei einem Knockdown von ADRP wurde hingegen eine Erhöhung von Tip47 auf der Oberfläche von Lipidtropfen in Huh7-Zellen beobachtet [63]. Im Gegensatz zum Knockdown von Tip47 wurde eine 2-bis 4-fache Erhöhung der Expression von ADRP festgestellt [64]. Daher wird vermutet, dass ADRP das Fehlen von Tip47 kompensieren kann.

4.3.4 FSP27

Neben der Familie der PAT-Proteine ist in den letzten Jahren eine weitere Gruppe der Oberflächenproteine von Lipidtropfen, die CIDE-Proteine (Cell death-inducing DFF45-like effector), in den Fokus gerückt [40, 65]. Während CIDEA und CIDEB überwiegend in Adipozyten exprimiert werden, wird CIDEB speziell in der Leber exprimiert [66]. Eine besonders wichtige regulatorische Funktion scheint CIDEA (auch genannt „fat-specific protein of 27 kDa“

(FSP27)) zu besitzen. So resultierte die Reduktion von FSP27 in murinen weißen Adipozyten mit Hilfe von siRNA in die Bildung von zahlreichen kleinen Lipidtropfen, in eine erhöhte Lipolyse und eine verringerte TAG-Speicherung [67]. Neben der hohen Expression von FSP27 im braunen und weißen Fettgewebe wurde ebenfalls eine hohe Expression im Muskel und in der Fettleber von Tiermodellen nachgewiesen [40, 68, 69]. In Hepatozyten führte eine Überexpression von FSP27 in vitro und in vivo zu einer erhöhten Bildung von LDs und zeitgleich zu einem erhöhtem TAG-Gehalt. Die Inhibierung von FSP27 führte hingegen zu einer Unterdrückung der TAG-Akkumulation in db/db Mäusen mit fehlender Phosphatase MKP-1 [68]. Insbesondere hemmt die leberspezifische Ablation des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR γ) die FSP27-Expression deutlich und deutet daraufhin, dass die Expression von FSP27 in der Leber von PPAR γ kontrolliert wird [66]. In Adipozyten wurde die Anreicherung von FSP27 zwischen Kontaktstellen zweier LDs beobachtet. Es wird vermutet, dass FSP27 beim Lipidtransfer von einem kleinen zu einem größeren LD involviert ist und somit einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von LDs hat [28]. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung der Akkumulation von vielen kleinen LDs in FSP27-defizienten primären weißen Adipozyten im Vergleich zum normalen weißen Adipozyten mit einem großen LD untermauert [67, 70].

5 Experimentelle Untersuchungen

5.1 Dynamik von Lipidtropfen *in vitro*

5.1.1 Effekte der Oleatbehandlung auf die zeitabhängigen LD-Größenverteilungen in PLC-Zellen

Um die Effekte einer zeitabhängigen Fettbeladung auf die intrazelluläre Lipidtropfenverteilung zu untersuchen, wurden humane Leber-Tumorzellen mit 0,5 mM BSA-gekoppeltem Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch für 1, 3, 6 und 24 Stunden inkubiert und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt und anschließend unter Live-Cell-Imaging-Bedingungen detektiert. Durch die Behandlung mit 0,5 mM BSA-gekoppeltem Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch war eine signifikante Zunahme der Lipidtropfengröße im zeitlichen Verlauf von 1, 3, 6, und 24 Stunden im Vergleich zu den Kontrollzellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop zu beobachten (Abbildung 5).

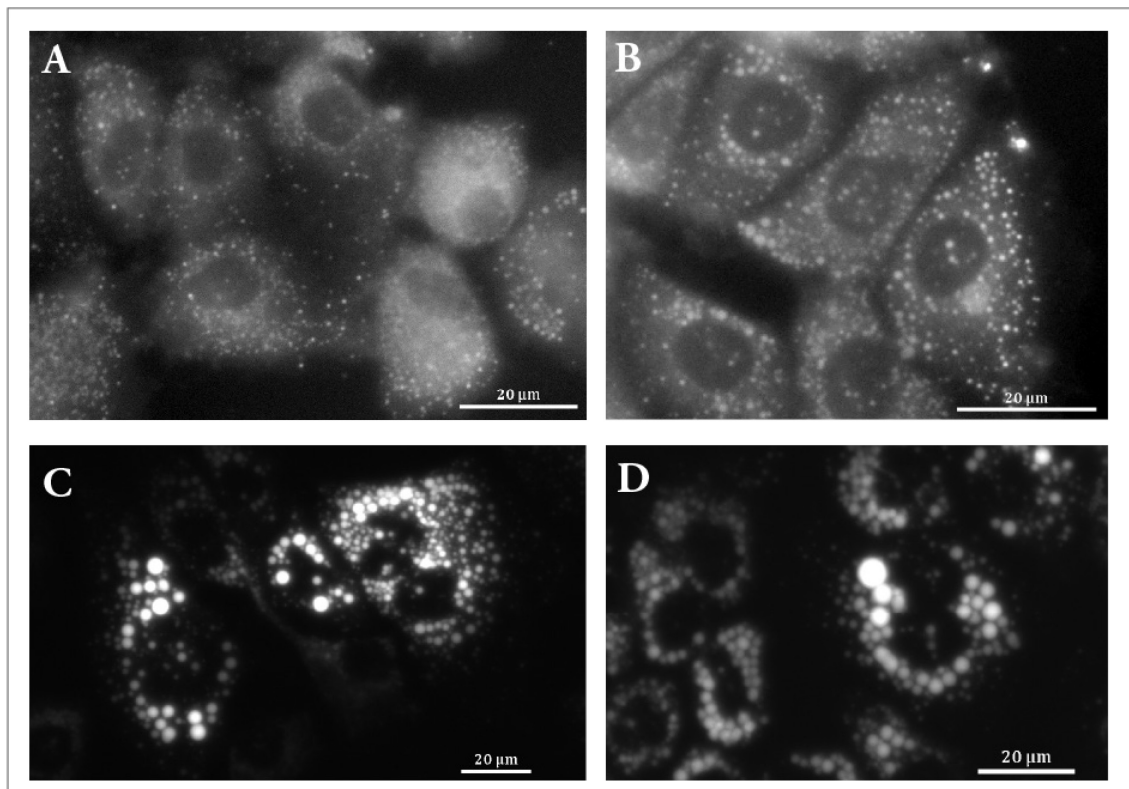


Abbildung 5: Immunfluoreszenzmikroskopie „Live Cell Imaging“ von Lipidtropfen in PLC-Zellen nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) für 1 h (A), 3 h (B), 6 h (C) und 24 h (D).

Um die Größenverteilungen der Lipidtropfen (LDs) zu den unterschiedlichen Zeitpunkten vergleichen zu können, wurden die Aufnahmen mit der NIS-Elements-Software von Nikon analysiert (siehe 9.1.2.3). Die Durchmesser der kleinsten beobachtbaren Lipidtropfen lagen im Bereich von 0,4 bis 0,6 µm (Abbildung 6). Nach 1 h Inkubation mit FFSs lag der maximale Durchmesser der Lipidtropfen im Bereich von 1,4 bis 1,6 µm. Nach 24 Stunden stiegen die

maximalen Durchmesser auf 2,8 bis 3,0 μm . Charakteristisch für die LD-Größenverteilung ist zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h und 6 h die große Anzahl an kleinen LDs ($<1\mu\text{m}$) und die geringe Anzahl an großen LDs ($>1\mu\text{m}$). Es wird vermutet, dass ein Teil sehr kleiner LDs aus technischen Gründen nicht detektiert wurde. Die kleinsten LDs (ausgereift) wurden in Drosophila-Zellen mit einem Durchmesser im Bereich von 250-500 nm gemessen [29, 79].

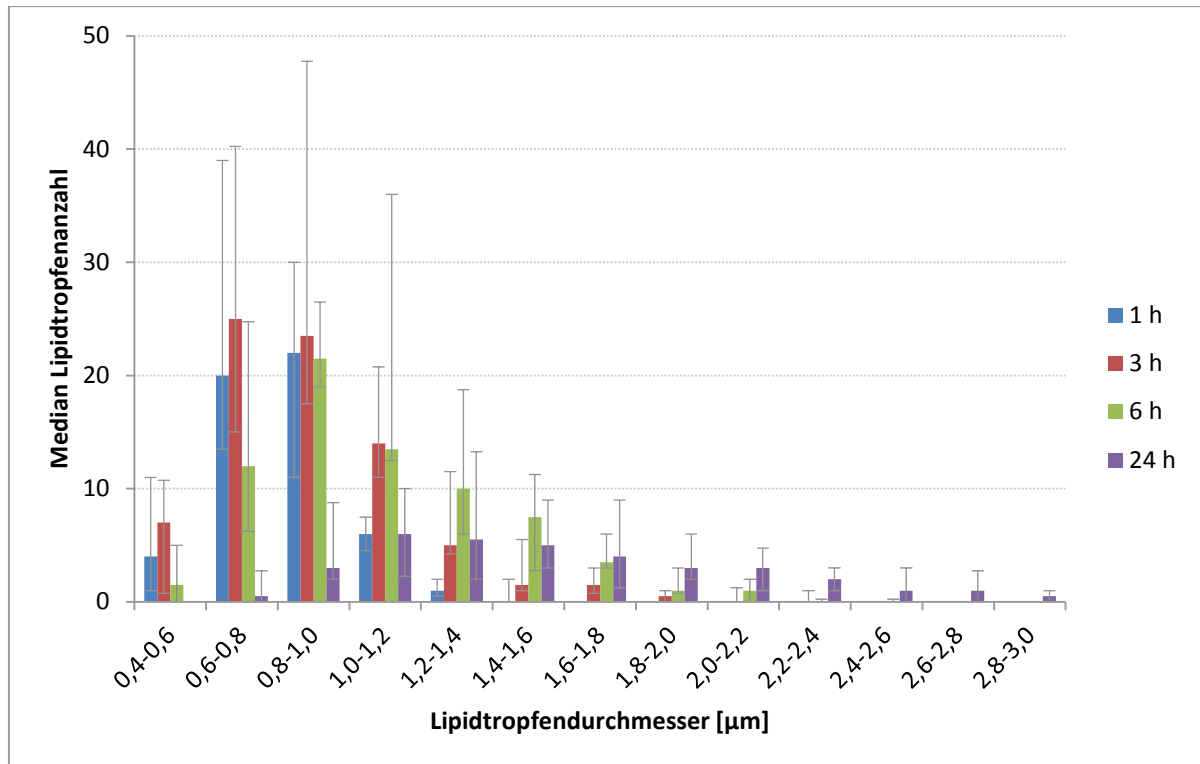


Abbildung 6: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung in PLC-Zellen nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) für 1, 3, 6 und 24 Stunden

Der Median der LD-Größenverteilungen zeigte über die Zeit eine klare Verschiebung hin zu großen LDs. Das bedeutet, dass die große Anzahl der kleinen LDs über die Zeit abnimmt und gleichzeitig einige wenige große LDs gebildet werden.

Gleichzeitig stieg mit der Zunahme der Lipidtropfengröße in FFS-behandelten PLC-Zellen auch der Median des Gesamt-TAG-Gehalts einer Zelle an (Abbildung 7). Der TAG-Gehalt wird über die Dichte von TAG, den Durchmesser der gemessenen Lipidtropfen mit der dementsprechenden Anzahl und dem Volumen der Zelle berechnet. Der Median des Gesamt-TAG-Gehalts einer Zelle versiebenfachte sich fast innerhalb von 23 h von 22,7 mM (1 h) auf 151 mM.

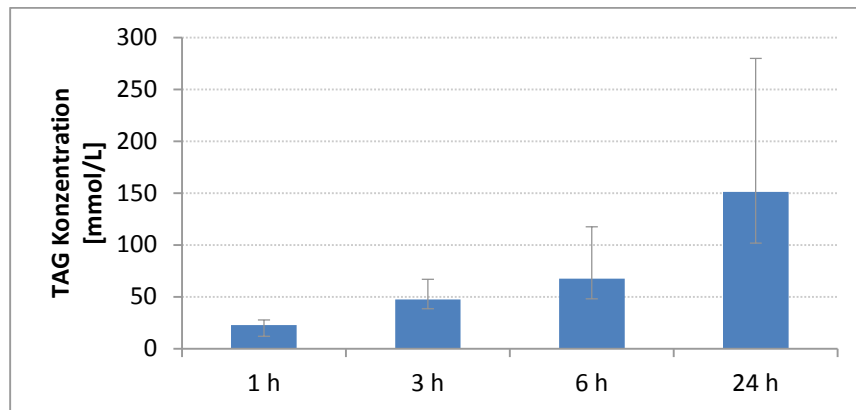


Abbildung 7: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von PLC-Zellen nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 1, 3, 6 und 24 Stunden.

Die enorme Zunahme des Gesamt-TAG-Gehalts lässt sich auf das Entstehen von wenigen großen Lipidtropfen zurückzuführen (Abbildung 8). Nach 24 h haben sich nur wenige Lipidtropfen (30 %) mit einem Durchmesser $> 1,8 \mu\text{m}$ gebildet (Abbildung 6), in denen sich aber fast 70 % des Gesamt-TAG-Gehalts der Zelle befinden (Abbildung 8). Das bedeutet auch, dass ein LD mit dem Durchmesser von $3 \mu\text{m}$ die gleiche Menge TAG wie 23 LDs mit dem Durchmesser von $0,7 \mu\text{m}$ speichert. Die Konsequenzen der Verschiebung der LD-Größenverteilung nach rechts wird durch die Betrachtung des Gesamt-TAG-Gehalts deutlich. In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die Zelle neusynthetisiertes TAG über den Zeitraum von 24 h in tendenziell größere LDs speichert.

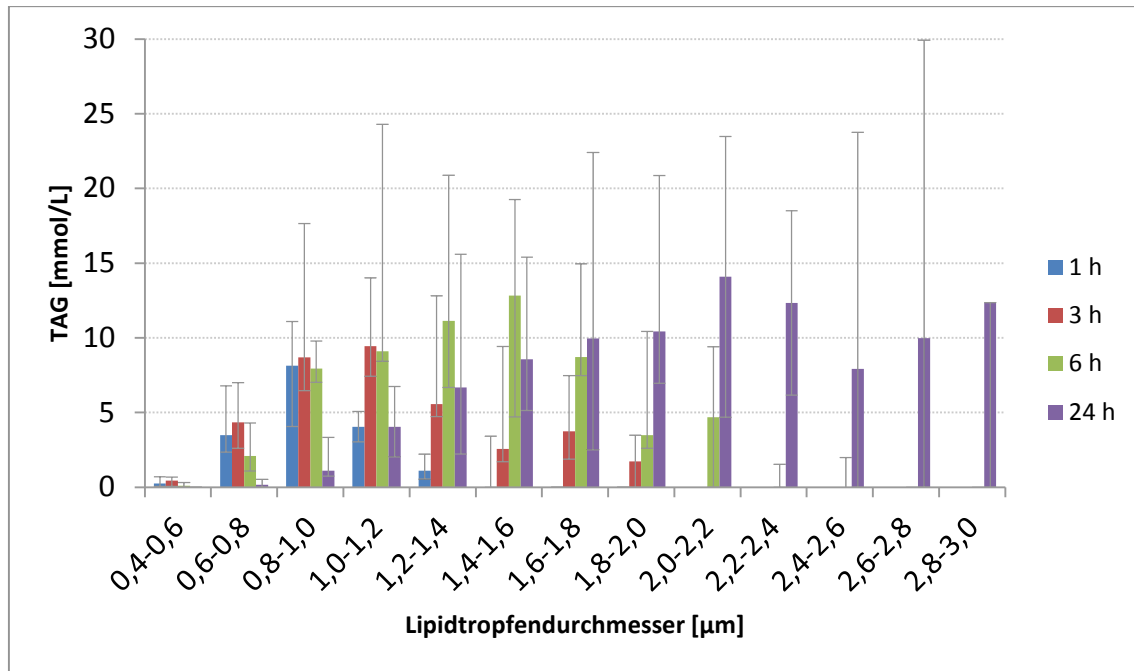


Abbildung 8: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von PLC-Zellen nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 1, 3, 6 und 24 Stunden.

Des Weiteren wurde eine stark heterogene Verfettung der PLC-Zellen nach 24 Stunden beobachtet (Abbildung 9). In Abbildung 9 ist der TAG-Gehalt jeder einzelnen Zelle (insgesamt 34 Zellen) nach 24 Stunden Inkubation mit FFSs dargestellt. Es ist zu erkennen, dass 20 % (orange Balken) der PLC-Zellen sehr stark (>400 mM) verfettet sind. Die Heterogenität der einzelnen PLC-Zellen ist auch in den LD-Größenverteilungen zu beobachten (Abbildung 30). Die LD-Größenverteilungen der Lipidtropfen weisen eine deutliche Variation zwischen den einzelnen PLC-Zellen auf.

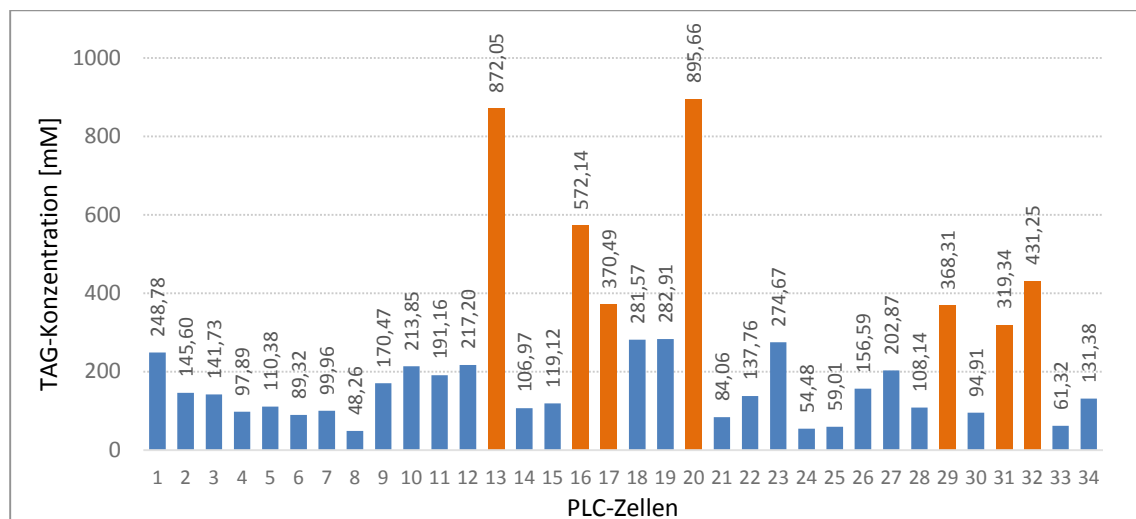


Abbildung 9: Quantifizierung des intrazellulären TAG-Gehalts einzelner PLC-Zellen nach Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24 h Stunden.

5.1.2 Effekte der Oleatbehandlung auf die zeitabhängigen Lipidtropfenverteilungen in primären humanen Hepatozyten

Die experimentellen Daten von primären humanen Hepatozyten wurden von Theresa Schulz im Labor von Dr. Georg Damm (Charité) erhoben und die Aufnahmen zur Verfügung gestellt. Die Daten von Verfettungsexperimenten mit zuvor aus tumorfreiem Gewebe isolierten primären humanen Hepatozyten wurden mit Hilfe der NIS-Elements-Software ausgewertet. Es wurden die Ergebnisse aus fünf verschiedenen Patienten quantifiziert, wobei zwei Patienten zu Beginn des Experiments einen hohen Lipidspiegel und drei Patienten einen niedrigen Lipidspiegel der Leber aufwiesen. Die Zellen wurden vor Beginn des Experimentes 12 h in Kulturmedium ohne Zugabe von FFSs nach der Leberresektion von 5 Patienten inkubiert. In Abbildung 10 sind als Beispiel primäre humane Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten eines Patienten mit einem niedrigen Anfangslipidspiegel dargestellt.

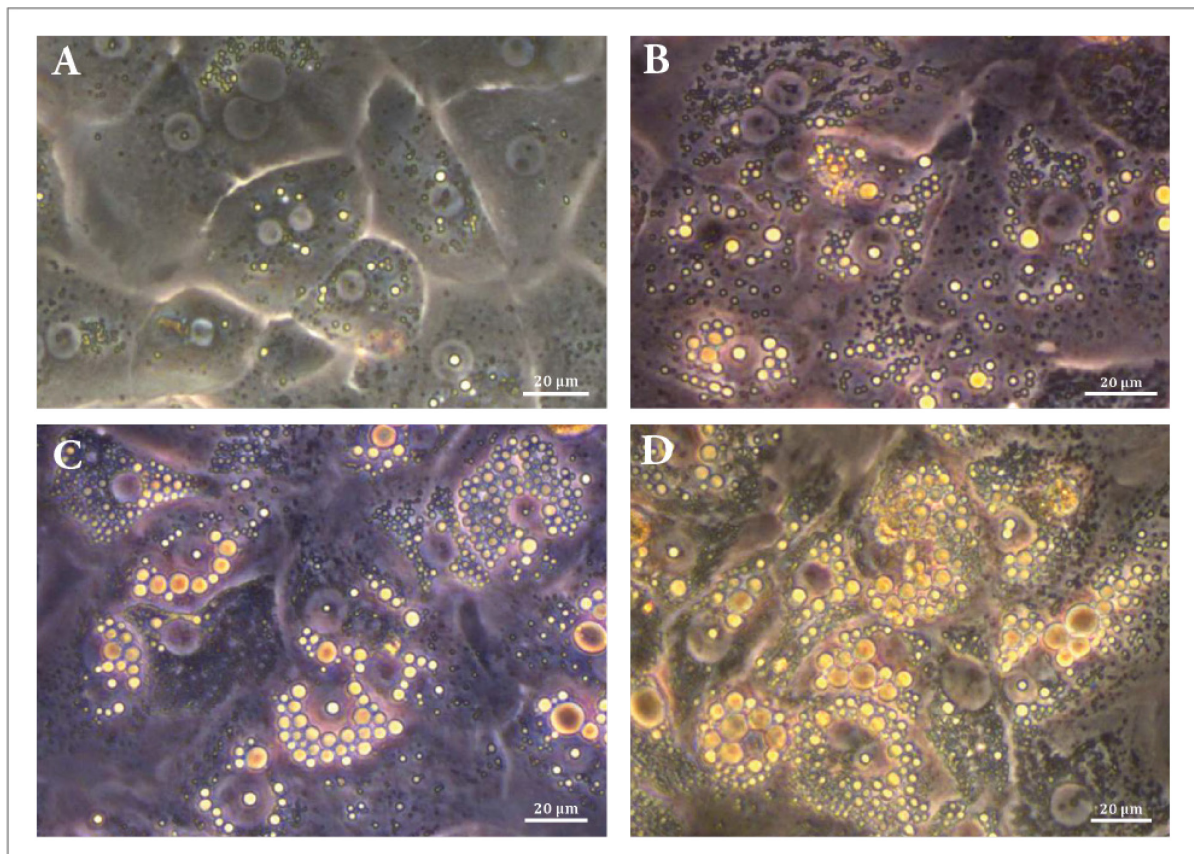


Abbildung 10: Phasenkontrastbilder von intrazellulären Lipidtropfen von primären humanen Hepatozyten. Gezeigt wird das zeitabhängige Wachstum von Lipidtropfen nach der Behandlung mit 0,5 mM Oleat/Palmitat-Gemisch nach A: 0 h (12h) B: 24 h C: 48 h und D: 72 h.

Die Phasenkontrastbilder in Abbildung 10 zeigen über den Zeitraum von 0 h bis 72 h eine Zunahme der Größe von Lipidtropfen in primären humanen Hepatozyten nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch auf. Nach der detaillierten Quantifizierung der Aufnahmen zeigt sich ebenfalls eine Zunahme der Anzahl und Größe der LDs (Abbildung 11). Zum Zeitpunkt null liegt der maximale Durchmesser der Lipidtropfen bei den Patientendaten

mit niedrigem Anfangslipidgehalt im Bereich 2,4 bis 2,6 μm . Nach 72 h wurden Lipidtropfen mit einem Durchmesser von bis zu 5,8-6,0 μm quantifiziert. Die Größenverteilung der Lipidtropfen verschiebt sich über den Zeitraum von 72 h deutlich hin zu großen LDs. Diese Verschiebung des Medianes der LD-Größenverteilung wird ebenfalls in den zwei weiteren Patienten mit niedrigem Anfangslipidgehalt beobachtet (siehe Abbildung 38 und Abbildung 41). Im Vergleich dazu ist bei Patienten mit hohem Anfangslipidgehalt ist eine geringe bis keine Verschiebung der Verteilung hin zu großen LDs zu erkennen (siehe Abbildung 32 und Abbildung 35). Die primären humanen Hepatozyten haben womöglich aufgrund des hohen Lipidgehalts zu Beginn eine geringere Kapazität weiteres TAG zu speichern.

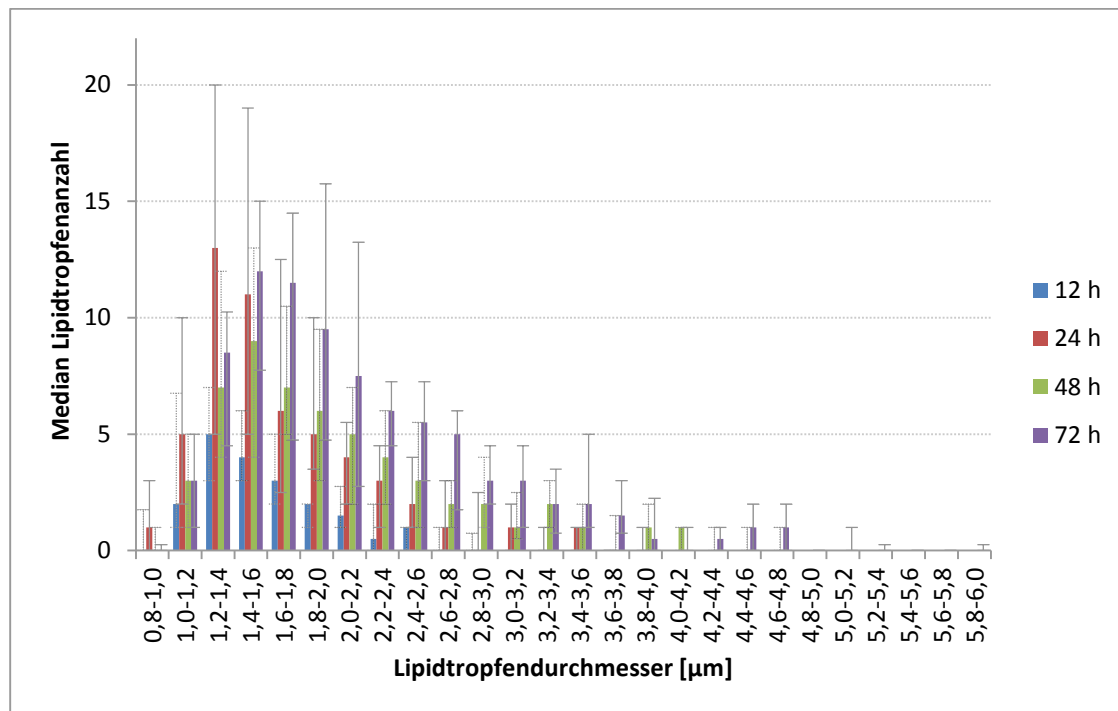


Abbildung 11: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von primären humanen Hepatozyten (Patient 4) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

Die Verschiebung der LD-Größenverteilung nach rechts korreliert mit dem Anstieg des TAG-Gehalts der Zelle. Der Median der Gesamt-TAG-Konzentration steigt vom Zeitpunkt null von 23,4 mM auf 232,9 mM nach 48 h in einer Zelle. Nach 48 Stunden ist im weiteren Zeitverlauf kein signifikanter Anstieg mehr zu beobachten (Abbildung 12). Diese Beobachtung trifft auch auf einen der zwei weiteren Patienten mit niedrigem Anfangslipidgehalt zu (Abbildung 37).

Bei Patienten mit einem hohen hepatischen Anfangslipidgehalt sind die Ergebnisse des TAG-Gehalts widersprüchlich (Abbildung 31 und Abbildung 34). Gründe können eine verringerte Zellvitalität und der hohe Anfangslipidgehalt sein.

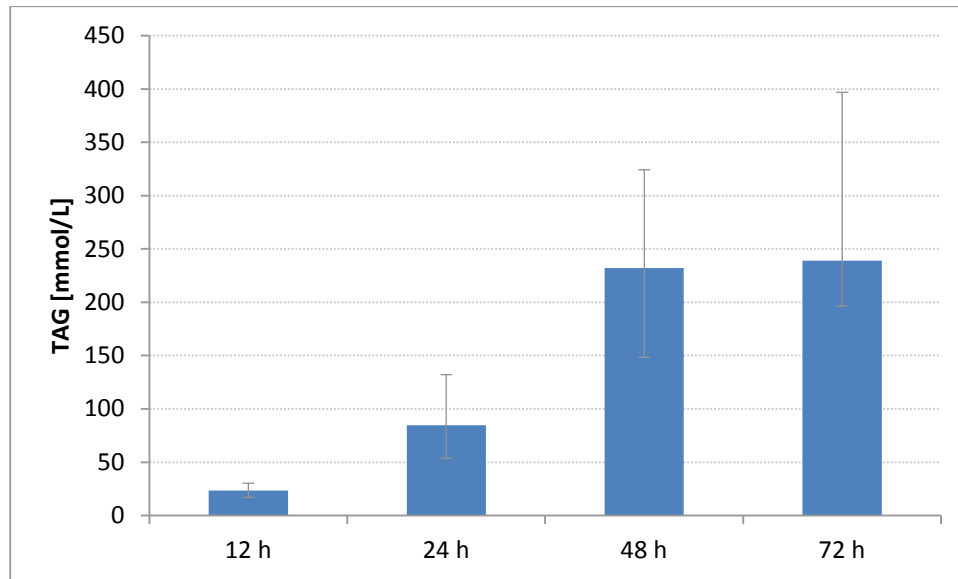


Abbildung 12: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von primären humanen Hepatozyten (Patient 4) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation und der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

Die LD-Größenverteilungen von Lipidtropfen in primären humanen Hepatozyten weisen eine hohe Variabilität in der Größe und Anzahl auf (Abbildung 44). Diese Beobachtung spiegelt sich bei allen Patientendaten zu verschiedenen Zeitpunkten wider. Die Verfettung der Zellen ist durchgängig stark heterogen.

6 Mathematische Modellierung

6.1 Modellbeschreibung

Das kinetische Modell beschreibt die Dynamik der Lipidtropfenbildung in einem Einzelzell-Modell. Die molekularen Prozesse sind in Abbildung 13 dargestellt. Des Weiteren werden den Nummern, die in Klammern stehen den nummerierten Prozessen in Abbildung 13 zugeordnet. Das Modell ist in ein metabolisches Modell und in ein Lipidtropfen/Lipoproteinmodell unterteilt.

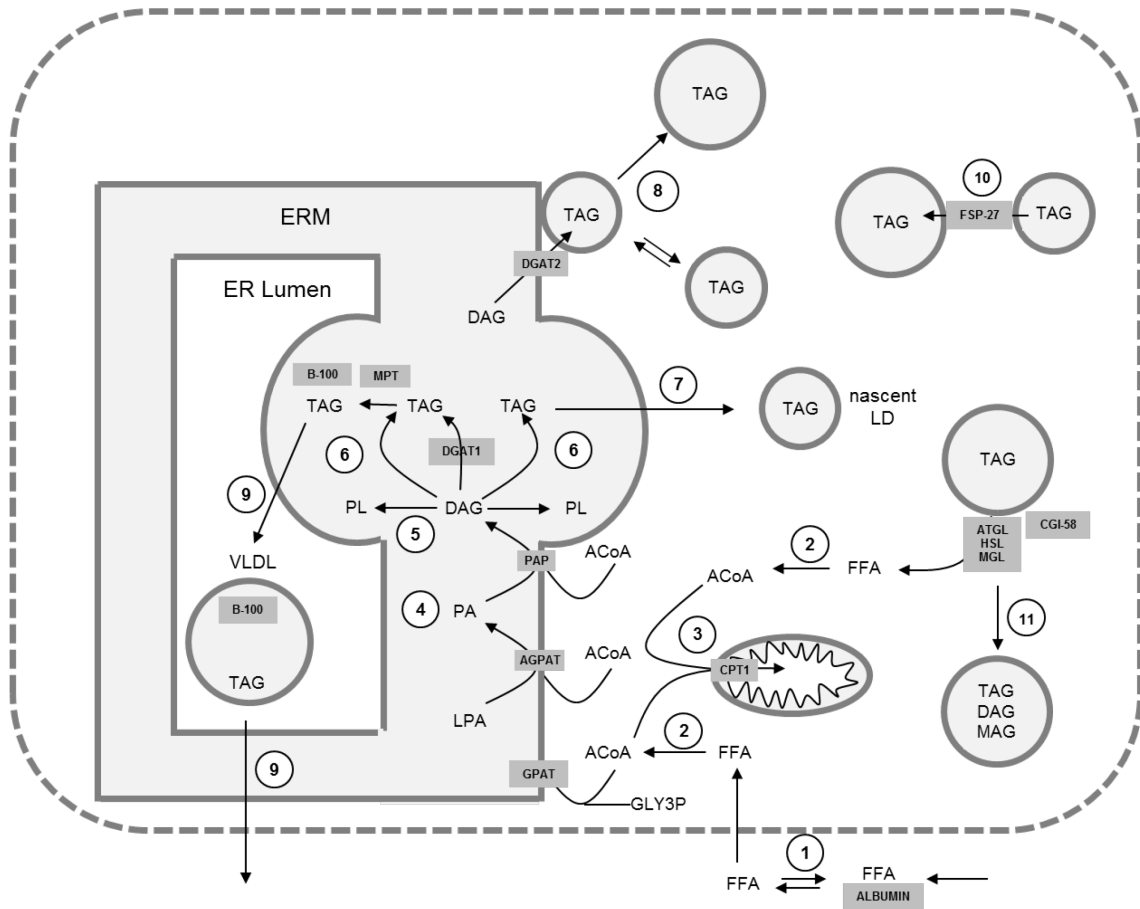


Abbildung 13: Schematische Darstellung der im Modell enthaltenen Prozesse: (1) Zufluss von nicht veresterten freien Fettsäuren (FFS); (2) Aktivierung von FFS; (3) Aufnahme von Acyl-CoA in die Mitochondrien; (4) Stoffwechselweg der DAG Synthese; (5) Synthese der Phospholipide; (6) TAG-Synthese durch DGAT1 und DGAT2 in verschiedenen Teilbereichen des ERs; (7) Knospung des „nascent“ Lipidtropfens; (8) reversibles Andocken von LDs an die ER-Membran und Auffüllung mit TAG durch DGAT2; (9) Synthese und Export von VLDL Lipoproteinen; (10) Lipidtransfer zwischen LDs/Fusion von Lipidtropfen; (11) Lipolyse von LDs.

Das metabolische Modell umfasst die Aufnahme von freien Fettsäuren (FFSs) aus dem Blutplasma (1), wobei bis zu 5 FFSs reversible mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten an Albumin binden können. Fettsäuren sind im Blutplasma weitgehend mit Albumin gebunden. Die Leber nimmt nur freie Fettsäuren auf. Die freie Fettsäurekonzentration wurde über das

angenommene Gleichgewicht zwischen freien Fettsäuren und Albumin gebundenen Fettsäuren berechnet (siehe 9.3).

Des Weiteren berücksichtigt das metabolische Modell zwei verschiedene Arten von Fettsäuretransport durch die Zellmembran eines Hepatozyten: (i) passives „flip flop“ von freien Fettsäuren mittels Diffusion ohne Beteiligung von Proteinen [80, 81] und (ii) einen aktiven protein-vermittelten Transport von freien Fettsäuren hauptsächlich durch CD36, der durch die Menge von CD36 reguliert wird [82]. Die Leberzelle nimmt >90% der Fettsäuren über einen aktiven protein-vermittelten Fettsäuretransport mit CD36 auf [83].

Nachdem Transport durch die Zellmembran werden die FFS sehr schnell durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA aktiviert (2). Acyl-CoA kann dann entweder als ATP-lieferndes Substrat in die Mitochondrien durch den Membrantransporter CPT-1 aufgenommen (3) und in der β -Oxidation als Acetyl-CoA dem Citrat-Säure-Zyklus zugeführt werden. Der Prozess des Membrantransports von FFS mit CPT-1 ist der ratenlimitierende Schritt in der Degradation von FFS d.h. die Aktivität von CPT-1 gilt als Maß für die mitochondriale β -Oxidation von Acyl-CoA. Oder das Enzym Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) katalysiert die aktivierte Fettsäure mit Glycerin-3-Phosphat zu Lysophosphatidsäure (LPA). In der Triacylglycerolbiosynthese katalysiert GPAT den raten-limitierenden Schritt [84, 85]. Das dafür benötigte Glycerin-3-Phosphat kann die Leberzelle entweder durch die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat mit der Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase gewinnen oder Glycerin über direkte Phosphorylierung mit der Glycerinkinase zu Glycerin-3-Phosphat umwandeln. Im weiteren Schritt wird Phosphatidsäure (PA) durch das Anfügen eines weiteren Acylrests an LPA gebildet (4).

Die hydrolytische Spaltung der Phosphatgruppe von PA ergibt 1,2-Diacylglycerin (DAG). Entweder wird DAG in der Phospholipidsynthese für den Membranaufbau durch die Synthese zu Phosphatidylcholin verwendet oder durch die Veresterung einer weiteren Fettsäure durch Diacylglycerin-Acyltransferase (DGAT) zu Triacylglycerol (TAG) im endoplasmatischen Reticulum (ER) katalysiert [86]. Für die Synthese von Phospholipids können DAG und PA ebenfalls verwendet werden (5).

Den letzten Schritt der Triacylglycerolbiosynthese katalysieren zwei Isoformen der Diacylglycerin-Acyltransferase DGAT1 und DGAT2. In der ER-Membran sind DGAT1 und DGAT2 integrale Membranproteine bei denen eine bestimmte Funktion in verschiedenen Bereichen des ERs vermutet wird [87]. Im Modell wird angenommen, dass der TAG-Pool der ER-Membran durch DGAT1 synthetisiert wird und für die De-novo-Synthese von Lipidtropfen (6) und Lipoproteinen (7) verwendet wird. Die Bildung eines VLDL-Lipoproteins ist als ein Transfer von DGAT1 synthetisierten TAG zum ApoB100 Protein durch MTP modelliert. Die Menge von ApoB100 wird durch die insulinabhängige Degradation kontrolliert und reguliert die Plasmakonzentration von TAG [88, 89]. Das ApoB-Protein 100 ist ein wesentlicher Bestandteil

des TAG-Exports, dass die Rate der Synthese im ER und damit die Gesamtrate der VLDL Produktion kontrolliert. Die Synthese der VLDLs und die Freisetzung in das Blutplasma werden in einem einzigen Schritt modelliert.

DGAT2 allerdings interagiert mit aufkeimenden Lipidtropfen und synthetisiert direkt TAG in Lipidtropfen (8). Zusätzlich bildet DGAT2 TAG in der ER-Membran, die für die De-novo-Bildung von LDs verwendet wird. Die De-novo-Fettsäuresynthese und die Freisetzung von FFS durch lysosomalen Abbau, der Endozytose von Lipoproteinen oder Autophagie von Lipidtropfen sind nicht im Modell berücksichtigt.

Das Lipidtropfen/Lipoprotein Modell beinhaltet alle soweit bekannten Prozesse, die die Dynamik von Lipidtropfen und den Export von Lipoproteinen VLDL kontrollieren. Im Modell sind die Lipidtropfen in diskrete Größen-(=Volumen)klassen LD_i ($i=1, \dots, N_c$) unterteilt und mit regulatorischen Oberflächenproteinen versehen (siehe Abschnitt unten). Der kleinste „nascent“ Lipidtropfen (nLD) wird an der ER-Membran durch die De-novo-Synthese gebildet. Jede Klasse der Lipidtropfen besitzt eine Gesamtmenge an Lipidspezies L (=TAG, DAG, MAG). Die Lipidtropfenanzahl in einer bestimmten Lipidtropfenklasse wird durch das Volumen und die Dichte der Lipidspezies (Tabelle 2) und das Volumen der Lipidtropfen der zugehörigen Lipidtropfenklasse berechnet. Das Steigen oder Sinken der Menge irgendeiner Lipidspezies L_i in einer Lipidtropfenklasse LD_i wurde als Lipidtransfer zu der nächst höheren oder niedrigeren Größenklasse $L_i \rightarrow L_{i\pm 1}$ modelliert.

Das weitere Wachstum der Lipidtropfen wird mit unterschiedlichen Prozesswegen beschrieben: Als Erstes können Lipidtropfen mit der ER-Membran reversibel binden und über DGAT2 mit neu synthetisierten TAG aufgefüllt werden (8). In diesem Fall assoziiert DGAT2 mit der ER-Membran und oder mit den LDs. Bei dem Auffüllprozess ist die Auffüllrate der jeweiligen Klasse der LDs abhängig von der Anzahl der LDs. Je mehr LDs es in einer jeweiligen Klasse gibt, umso höher ist der fraktionelle Anteil von DGAT2 (Auffüllprozess) der jeweiligen LD Klasse. Der geringere fraktionelle Anteil von DGAT2 ist mit der ER-Membran assoziiert und synthetisiert TAG für die LD Bildung. Es wird angenommen, dass große LDs weniger mit der ER-Membran assoziieren und durch DGAT2 aufgefüllt werden.

Als Zweites können LDs ihren Lipidgehalt untereinander fusionieren. Dabei nimmt ein großer LD einen Kleineren auf (11). Die Lipidtransferrate hängt in diesem Fall von der Größendifferenz zwischen den LDs und dem Durchmesser des kleineren LDs ab [90]. Zusätzlich wird zum Transferprozess das Protein FSP27 auf der Oberfläche des zu fusionierenden LDs benötigt [28].

Der Prozess des Schrumpfens der LDs wird im Modell über den Abbau von Fettsäuren von Lipidestern der TAG, DAG und MAG modelliert (13). Dabei katalysiert die Lipase ATGL vorzugsweise die Umformung von TAG zu DAG und hat eine konstante Basalrate. Die Aktivität von ATGL kann aber auch nach der Bindung mit CGI-58 steigen und somit die Hydrolyse

beschleunigen [91]. Die Hormon-sensitive Lipase (HSL) wird durch hormon-abhängige Phosphorylierung aktiviert [92] und bevorzugt die Hydrolyse von Diacylglycerol (DAG) [93]. Die stimulierte HSL kann über Perilipin an die Oberflächen von Lipidtropfen binden und TAG, DAG oder MAG hydrolysieren [94]. Im letzten Schritt der TAG-Lipolyse spaltet die Monoglyceridlipase (MAG) das noch vorhandene Monoglycerid zu einer Fettsäure und Glycerin auf.

6.1.1 Regulatorische Oberflächenproteine und LD-assoziierte Enzyme

Biogenese, Wachstum, Reifung und Degradation von LDs wird durch verschiedene regulatorische Oberflächenproteine (ROPs) und lipid-assoziierte Enzyme kontrolliert, die wahrscheinlich an die Oberfläche von LDs reversibel binden können. Allgemein kann man sagen, dass die Rate von jedem elementaren Schritt den Lipidgehalt der LDs beeinflusst und somit die Größe abhängig von der Häufigkeit der spezifischen ROPs und der Enzyme auf der Lipidtropfenoberfläche ist. Das Modell beinhaltet reversible Bindungen der folgenden ROPs zur Lipidtropfenoberfläche: TIP47, ADRP, Perilipin (PLIN1), CGI-58, FSP27, ATGL und HSL.

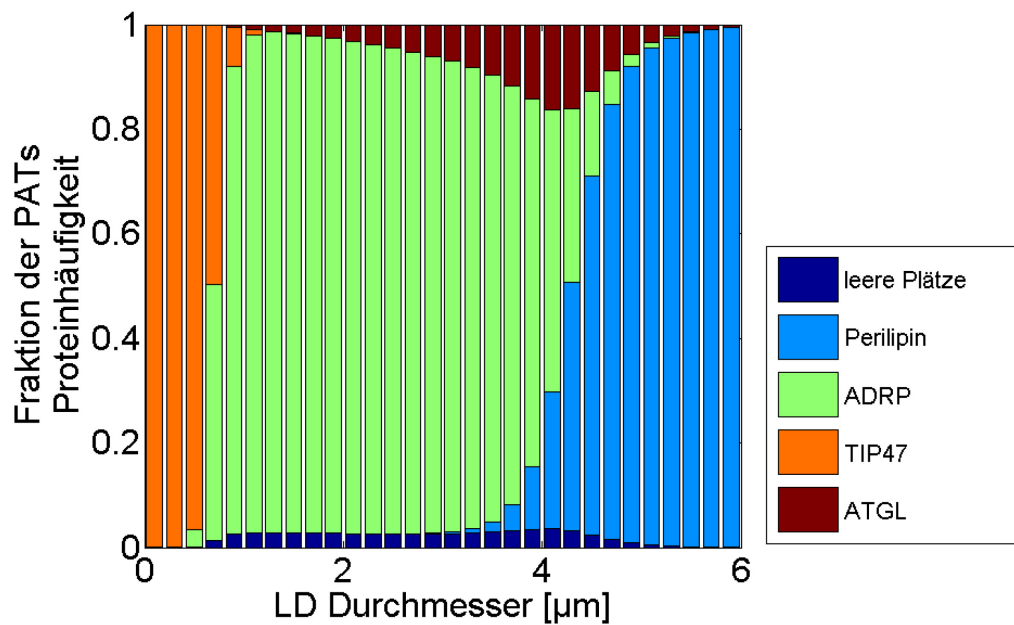


Abbildung 14: Mit Hilfe des Modells errechnete relative Besetzung der Lipidtropfenoberfläche durch ROPs als Funktion der LD-Größe; die Fraktion bezieht sich auf die ROP Bindungskinetik vom Referenzfall (normale Rattenhepatozyten)

Die klassischen PAT-Proteine TIP47, ADRP, Perilipin (PLIN1) konkurrieren um die gleichen unbesetzten Plätze auf der Lipidtropfenoberfläche. Die Assoziationskonstanten der PATs-Bindung hängen vom Radius der LDs und Fraktion der unbesetzten Plätze der Lipidtropfenoberfläche ab. Eine zusätzliche Regulierung findet über CGI-58 durch die Rekrutierung an die Lipidtropfenoberfläche durch ADRP und PLIN1 statt. Nach der Phosphorylierung von CGI-58 bindet diese an die ATGL und HSL, die ebenfalls die Fraktion der unbesetzten Plätze binden können. Ebenfalls wird FSP27 an die Lipidtropfenoberfläche rekrutiert abhängig von dem Radius der LDs. In Abbildung 14 wird die relative Besetzung der LDs mit ROPs und LD-assoziierten Enzymen als Funktion der LD-Größe dargestellt. Die dazugehörigen Assoziationskonstanten wurden mit einer Modellsimulation basierend auf einem umfangreichen Datensatz von unabhängigen Experimenten geschätzt (siehe Kapitel 6.2 Modellvalidierung und -parametrisierung).

6.1.2 Hormonelle Regulation

Das Modell beinhaltet regulatorische Proteine (HSL, CGI-58), die durch reversible Phosphorylierung reguliert werden. Des Weiteren ist die ApoB100-Degradation Insulin-sensitiv [95]. Für die Beschreibung des Verhältnisses zwischen dem Phosphorylierungszustand der hormon-sensitiven Proteine und der Plasmakonzentration von Insulin und Glukagon wird eine phänomenologischen Signalfunktion verwendet, die kürzlich publiziert wurde [96]. Diese empirische Glukose-Hormon-Transferfunktion beschreibt die Beziehung zwischen dem Plasmalevel von Glukose, Insulin und Glukagon. Die Ratengleichungen sind für alle Prozesse des kinetischen Modells in Kapitel 9.3 angegeben und näher erklärt.

Das kinetische Modell wurde in MATLAB (MathWorks, Version R2012b) implementiert.

6.2 Modellvalidierung und -parametrisierung

Die Modellvalidierung wurde mit Hilfe des Vergleichs von Modellsimulationen mit experimentell ermittelten Metabolitkonzentrationen und Flussraten im Lipidmetabolismus, wie auch mit Größenverteilungen von Lipidtropfen durchgeführt. Die experimentellen Ergebnisse stammen aus isolierten Hepatozyten und Lebern von Labortieren mit spezifischen Knockdown oder der Überexpression von Genen von metabolischen Enzymen oder auch regulatorischen Oberflächenproteinen von Lipidtropfen. Für die metabolischen Enzyme des Modells wurden verfügbare detaillierte kinetische Informationen berücksichtigt. Die maximale Enzymaktivität (v_{\max}) ist eine lineare Funktion der Proteinabweichungen, die in den unterschiedlichen physiologischen Zuständen der Leber variiert. Einer dieser Zustände kann z.B. die Steatose sein.

Deshalb wurden zahlreiche Werte der v_{\max} -Werte von metabolischen Experimenten geschätzt, in denen die Aufnahme der freien Fettsäuren, die Synthese der Triglyceride und der Export der Lipoproteine (VLDL) in Abhängigkeit der extrazellulären Konzentration der freien Fettsäuren gemessen wurden. In Abbildung 15A ist die Aufnahme der freien Fettsäuren von perfundierten Lebern in Abhängigkeit der extrazellulären FFS Konzentration dargestellt, die zwischen 0,1-1 mM variiert. Die Leber ist sehr wichtig für das Reinigen des Blutplasmas von freien Fettsäuren und das anschließende Verpacken in Lipoproteine VLDL oder die Umwandlung zu Ketonkörpern. In Abhängigkeit von externen Bedingungen speichert die Leber diese Fettsäuren in Form von TAG. Die Abhängigkeiten der FFS-Aufnahmerate von TAG-Gehalt der Zelle, der TAG-Synthese und des VLDL-Exports sind Abbildung 15B, D und E dargestellt. Es wurden die experimentiellen Daten mit den Modellsimulationen verglichen und die Parameter dementsprechend angepasst.

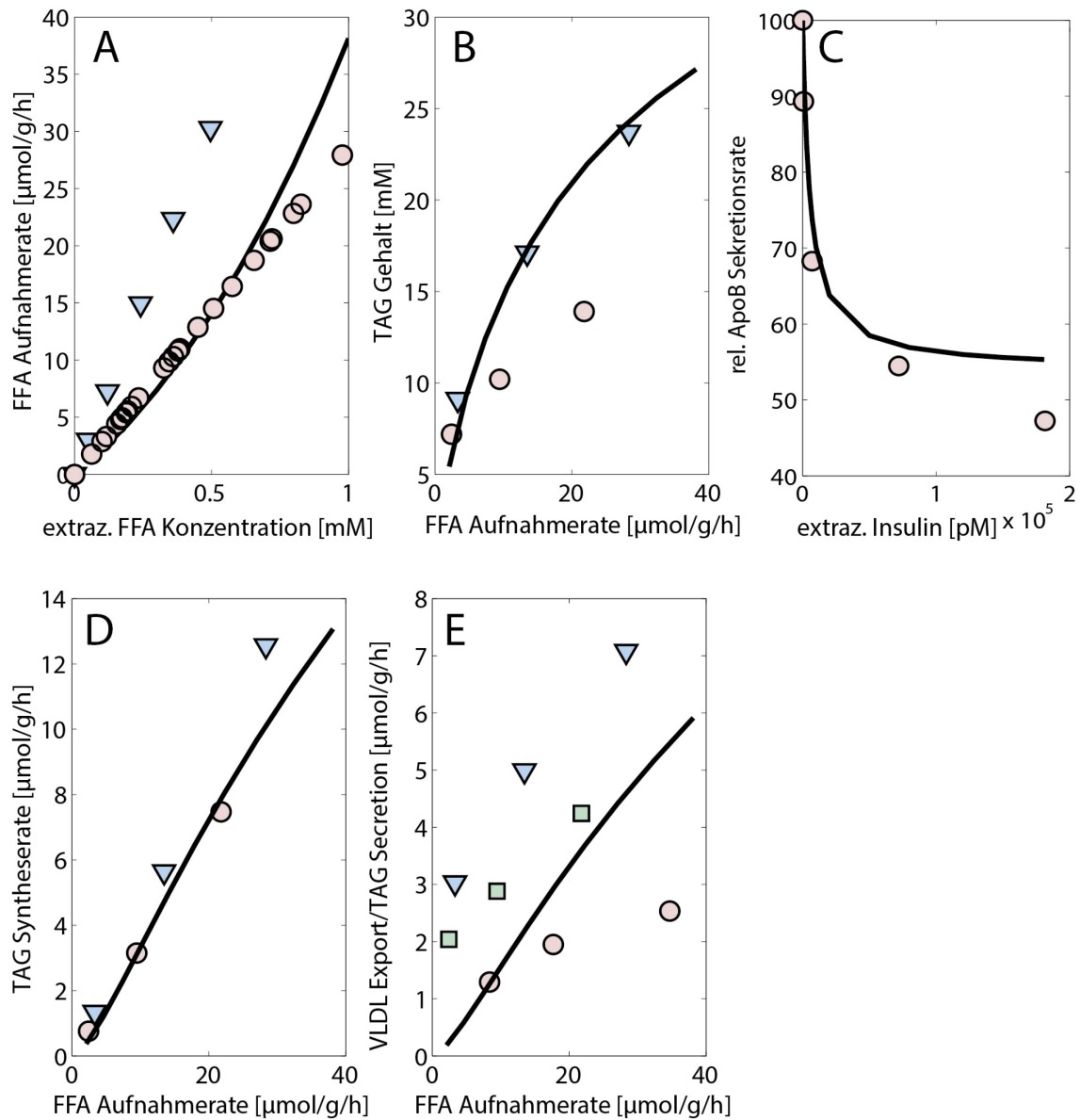


Abbildung 15: Vergleich von Modellsimulation mit experimentellen Daten von metabolischen Experimenten. A: Aufnahme rate der extrazellulären FFSs im Blutplasma in Abhängigkeit der FFSs Konzentration [97, 98]. B: TAG-Gehalt der Zelle in Abhängigkeit von der Aufnahme rate der extrazellulären FFSs im Blutplasma [99]. C: Relative ApoB-Sekretionsrate in Abhängigkeit von der extrazellulären Insulin Konzentration [100]. D: TAG-Syntheserate in Abhängigkeit von der Aufnahme rate der extrazellulären FFSs im Blutplasma [99]. E: VLDL-Export in Abhängigkeit von der Aufnahme rate der extrazellulären FFSs im Blutplasma [99, 101]. Die durchgehende Linie ist die Simulation und die Datenpunkte stellen die experimentellen Daten mit unterschiedlichen Formen für das jeweilige Experiment dar.

Die Raten der Bildungs- und Abbauprozesse von Lipidtröpfchen sind aufgrund der sehr geringen Literaturergebnisse weniger eindeutig. Die kinetischen Parameter der individuellen Prozesse, z.B. TIP-47 abhängige Synthese von „nascent“ LDs als Funktion des TAG-Gehalts im ER und der Menge an TIP-47 sind technisch anspruchsvoll und noch nicht vorhanden. Aktuelle Kenntnisse auf diesem Gebiet bauen vorwiegend auf Experimente mit Transfektionen, die spezifische regulatorische Proteine entweder abschalten oder überexprimieren und die dadurch bewirkte Änderung des TAG-Gehalts, die LD-Verteilung oder andere Funktionen des Lipidmetabolismus

messen. Daher wurden die zahlreichen Werte der Reaktionsraten und Bindungskonstanten so variiert, dass die endgültige Parametrisierung des Modells Simulationen ermöglicht, die mit einer guten Qualität mit Daten von zahlreichen unabhängigen Knockdown- und Überexpressionsexperimenten im Lebergewebe oder Hepatozyten übereinstimmen.

Alle experimentellen Ergebnisse und die dazugehörigen Modellsimulationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst und werden im unteren Abschnitt näher erläutert.

Tabelle 1: Prognostizierte und beobachtete Änderungen von ausgewählten metabolischen Parametern der leberspezifischen Inhibition oder Aktivierung von regulatorischen Oberflächenproteinen und metabolischen Enzymen. In Spalte 1 sind die jeweiligen Proteine dargestellt, deren Aktivität entweder erhöht (Pfeil nach oben) oder reduziert (Pfeil nach unten) wird. Ab Spalte 2 ist jede Spalte unterteilt in 1. Simulationsergebnis und 2. experimentelles Ergebnis. rote Pfeile deuten auf eine Diskrepanz hin und blaue Symbole beziehen sich auf Daten von anderen Zelltypen.

Protein	zelluläres TAG		VLDL-Sekretion	β-Oxidation		Phospholipid-Synthese	LD-Größenverteilung	
DGAT1	↑	↓	↑ [102] ↑ [103]	↑	↑ [102] ○ [103]	↓	↓ [104]	↔ [29, 105]
DGAT1	↓	↑	↓ [106] ↓ [29] ↑ [107]	↓	↓ [106] ○ [107]	○	○ [107]	↑
DGAT2	↑	↑	↑ [102] ↑ [103]	↓	○ [102]	↑	↓ [108] ↓ [107]	↔ [29, 105]
DGAT2	↓	↓	↓ [108] ↓ [106]	○	○ [107] ↓ [106]	↓	↑ [108] ↑ [107]	↔ [107] [29]
MTP	↑	↓		↑	↑ [109]	↓		↔
MTP	↓	↑	↑ [110]	↓	↓ [111] ↓ [112]	↑	↑ [110]	○
ATGL	↑	↓	↓ [11]	○	○ [113]	↑	↑ [11] ↑ [113]	↔ [114]
ATGL	↓	↑	↑ [113]	○	○ [113]	↓	↓ [113, 115]	↔ [114]
HSL	↑	↓	↓ [11]	○	○ [11]	↑	↑ [11]	○
HSL	↓	↑	↑ [116]	○		↓	↓ [116]	↔ [116]
CGI-58	↓	↑	↑ [117]	○	○ [117]	○	↓ [117]	○ [117]
FSP-27	↓	↓	↓ [118]	↑		○		↔ [118]
ADFP	↓	↓	↓ [60]	○		○		↔ [119]
TIP-47	↓	↓	↓ [64]	↓		↓		○ [60]

Die Simulationen wurden im stationären Zustand, in dem alle internen Variablen des Modells keine zeitlichen Änderungen mehr zeigten und im nicht stationären Bereich durchgeführt, der den Zeitraum von 1h umfasst. Der stationäre Zustand stimmt mit experimentellen Bedingungen überein, bei denen isolierte Hepatozyten mit konstanten metabolischen Bedingungen z.B. einer

Konzentration von FFSs im Medium eine ausreichende Zeit ausgesetzt waren, um einen neuen stationären Zustand zu erreichen. Ebenfalls wird auch bei gemessenen metabolischen Parametern z.B. die LD-Größenverteilung in Lebern oder Hepatozyten von transgenen Labortieren mit leberspezifischen Knockout oder Überexpressionen von verschiedenen regulatorischen Oberflächenproteinen ein stationärer Zustand angenommen. Nicht stationäre Bedingungen sind gegeben, wenn metabolische Parameter z.B. die Aktivität der β -Oxidation in einem kurzen Zeitintervall nach Beginn der Störung gemessen wurden.

Die Richtung der vorausgesagten und experimentell beobachteten Änderungen in den zentralen Parametern im LD und Lipidmetabolismus werden zusammenfassend in Tabelle 1 mit einem dicken Pfeil veranschaulicht. Die unwesentlichen Änderungen werden mit einem Kreis dargestellt und beim Fehlen von Daten für die Leber werden Daten von anderen Zelltypen mit blauen Symbolen veranschaulicht.

6.2.1 Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns des mikrosomalen Transferproteins (MTP)

In der Simulation der Überexpression von MTP verteilt sich neusynthetisiertes TAG in der ER-Membran von der De-novo-Synthese der LDs hin zum VLDL-Export. Diese Umverteilung resultiert in einen erhöhten TAG-Export und verringert den zellulären TAG-Gehalt (Abbildung 16B). Aufgrund dessen, dass die Rate der TAG-Lipolyse abhängig von der Anzahl der LDs ist, verringert sich die Rate der TAG-Degradation, die Verfügbarkeit von DAG für die Phospholipidsynthese und die β -Oxidation der FFSs.

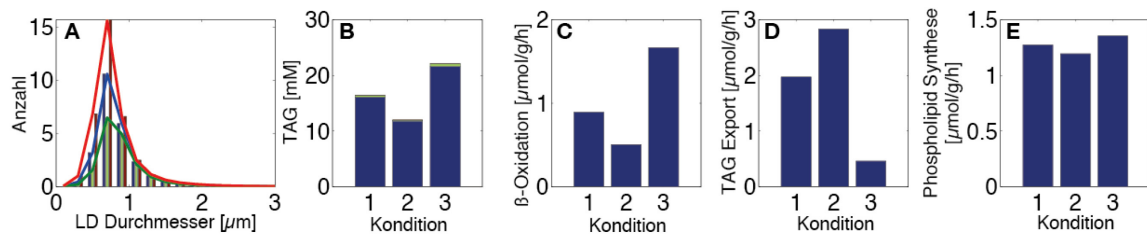


Abbildung 16: Überexpression und Knockdown des mikrosomalen Transferproteins im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: MTP Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: MTP-Knockdown: 0,1-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Dementsprechend ist beim MTP-Knockdown der TAG-Export verringert und der zelluläre TAG-Gehalt erhöht. Daraus resultiert ein erhöhter TAG-Umsatz und führt zu einer erhöhten PL-Synthese und β -Oxidation (Abbildung 16 C und E). Das bedeutet, dass veresterte Fettsäuren durch die Lipolyse freigesetzt werden und in der PL-Synthese und β -Oxidation verstoffwechselt werden. Die Anzahl der LDs wird in der Überexpression von MTP herabgesetzt und analog zum Knockdown erhöht. Die Lage des Medians ändert sich jedoch nicht. Raabe et al. haben mit einem leberspezifischen Knockdown in Mäusen die Reduktion im VLDL Triacylglycerol beobachtet und parallel die Abnahme von ApoB100 im Blutplasma gemessen [112]. In histologischen Untersuchungen wurde dann zusätzlich die Entwicklung einer moderaten Steatose und durch das Anfärben von Lipiden zahlreiche zytoplasmatische Lipidtropfen in MTP-defizienten Hepatozyten festgestellt. Auch Chang et al. konnten ebenfalls in einem leberspezifischen Knockdown von MTP mit dem Cre/loxP-System eine reduzierte Konzentration von ApoB100 im Blutplasma messen, dass die Produktion von Lipoprotein VLDLs verringerte [120]. Bei der Überexpression von MTP in Mäusen mit einem rekombinanten Adenovirus (AdhMTP) wurde eine signifikante Zunahme des VLDL-Exports und eine 3-fache Erhöhung der MTP Aktivität im Vergleich zur Kontrollmaus gemessen [109].

6.2.2 Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns der Diacylglycerol Acetyltransferase1 und 2

In der Simulation der Überexpression von DGAT1 verteilt sich neusynthetisiertes TAG in der ER-Membran hin zum VLDL-Export. DGAT1 verestert im letzten Schritt der Triacylglycerolbiosynthese DAG mit einer aktivierten Fettsäure zu TAG. Im Modell wird angenommen, dass DGAT1 bevorzugt TAG für den VLDL-Export synthetisiert. Der TAG-Export ist im Vergleich zum physiologischen Referenzzustand erhöht und analog beim Knockdown von DGAT1 reduziert (Abbildung 17D). Die β -Oxidation ist aufgrund des erhöhten TAG-Exports bei Überexpression von DGAT1 verringert und analog beim Knockdown von DGAT1 erhöht. Aufgrund des erhöhten TAG-Exports ist die Phospholipidsynthese reduziert und analog beim Knockdown erhöht. Auch in einer Studie mit humanen Lungenfibroblasten wurde die Abnahme der Phospholipidsynthese bei der Überexpression der DGAT1 beobachtet [104]. Bei der Überexpression von DGAT1 verschiebt sich die LD-Größenverteilung hin zu kleinen LDs im Vergleich zum Referenzzustand (Abbildung 17A grüne Kurve).

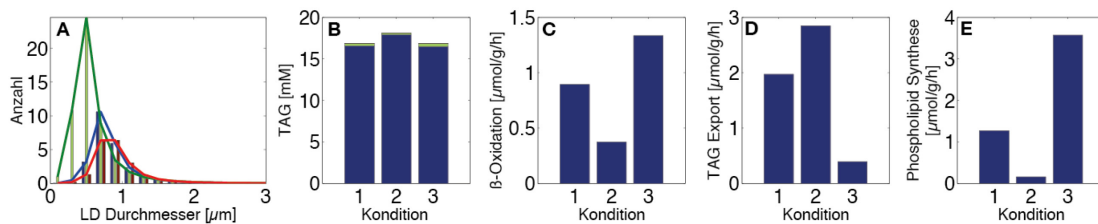


Abbildung 17: Überexpression und Knockdown von DGAT1 im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung,

B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: DGAT1 Überexpression: 8-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: DGAT1 Knockdown: 0.125-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Aufgrund des Anstiegs der Anzahl von kleinen LDs erhöht sich der TAG-Gehalt in der Zelle nur gering. Beim Knockdown von DGAT1 verschiebt sich die LD-Größenverteilung leicht hin zu größeren LDs und der TAG-Gehalt bleibt unverändert, was auf die erhöhte β -Oxidation und Phospholipidsynthese zurückzuführen ist. Yamazaki et al. konnten ebenfalls in DGAT1 überexprimierenden Mäusen eine Erhöhung des VLDL-Exports beobachten [102]. Auch stimmen die Ergebnisse mit einer in vitro Studie der Überexpression von DGAT1 in hepatoma Zellen von Ratten überein, die in der Erhöhung der VLDL-Sekretion resultierte [121]. Ebenfalls konnten in DGAT1 überexprimierenden RH7777-Zellen die vermehrte Bildung von kleinen LDs in der Peripherie beobachtet werden und untermauern das Simulationsergebnis. Die Beobachtung der Bildung von vielen kleinen LDs in der Überexpression von DGAT1 wurde in RNAi-behandelten Drosophila Zellen bestätigt, die 12 Stunden mit Ölsäure inkubiert wurden [29]. Die Reduzierung von DGAT1 führt zur Abnahme der Anzahl von kleinen LDs und zur Zunahme von großen LDs [29]. Ebenfalls resultierte die Abnahme der DGAT1 Aktivität in

murinen Hepatozyten in eine Zunahme der Anzahl von größeren LDs und des TAG-Gehalts der Zelle [107]. Die Phospholipidsynthese änderte sich in diesem Experiment ebenfalls nicht. Beim Knockdown in Mäusen mit Antisense-Oligonukleotiden konnte wie in der Simulation die Abnahme des TAG-Exports und auch die ApoB-Sekretion beobachtet werden [106].

Eine Diskrepanz zwischen Modellsimulation und experimentellen Beobachtungen [29, 102, 103, 106] findet sich im Einfluss der Änderung in der DGAT1 Aktivität auf den TAG-Gehalt wieder. Im Vergleich zu einigen experimentellen Beobachtungen sagt das Modell eine umgekehrte Beziehung zwischen zellulären TAG-Level und der Aktivität von DGAT1 voraus.

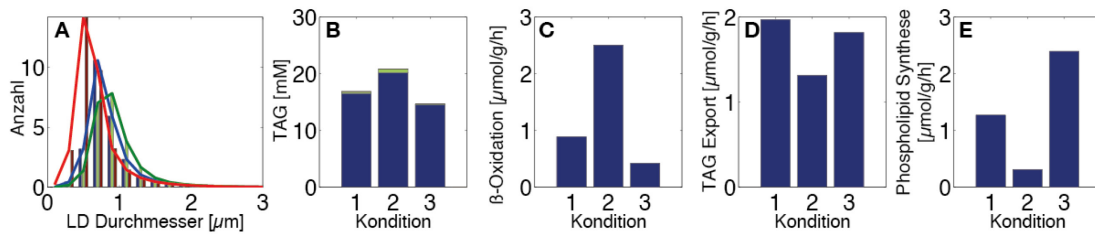


Abbildung 18: Überexpression und Knockdown von DGAT2 im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: DGAT2 Überexpression: 4-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: DGAT2 Knockdown: 0.25-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Im Vergleich zur Überexpression von DGAT2 stiegen der TAG-Gehalt und die β -Oxidation an und gleichzeitig verringerte sich der TAG-Export wie auch die Phospholipidsynthese (Abbildung 18B, C und D). Die LD-Größenverteilung verschiebt sich aufgrund des erhöhten Auffüllens der LDs mit TAG durch die DAGT2 hin zu großen LDs. Diese Verschiebung und die Erhöhung der LD-Größe konnte auch Wilfling et al. in Experimenten mit *Drosophila* Zellen beobachten [29]. Auch in DGAT2-transfizierten Mäusen wurden zahlreiche große LDs und ein signifikanter TAG-Anstieg bei der Überexpression von DGAT2 gemessen [105]. Im Modell präferiert DGAT2 die Auffüllung von LDs mit neusynthetisierten TAG. Im Vergleich zu einigen experimentellen Beobachtungen sagt das Modell aber eine umgekehrte Beziehung zwischen β -Oxidation und der Aktivität von DGAT2 voraus.

Beim Knockdown von DGAT2 werden der TAG-Gehalt, die β -Oxidation und TAG-Export leicht reduziert. Die LD-Größenverteilung wird durch die Zunahme der kleinen LDs ($<0,8 \mu\text{m}$) und die Abnahme großer LDs ($>1 \mu\text{m}$) im Simulationsergebnis beim Knockdown von DGAT2 hin zu kleinen LDs verschoben (Abbildung 18A rote Kurve). Wilfling et al. konnten ebenfalls bei der Reduzierung der Menge von DGAT2 einen Anstieg von vielen kleinen LDs und eine Verschiebung der LD-Größenverteilung nach links beobachten [29]. Auch bei der Reduzierung der Menge von DAGT2 in Ratten, die mit hochkalorischer Nahrung eine NAFLD entwickelten,

wurde eine Abnahme des Triacylglycerols und der daraus resultierende Anstieg der β -Oxidation gemessen [108].

6.2.3 Auswirkung des Knockdowns der PAT-Proteine

Die PAT-Protein-Familie ist assoziiert mit der Oberfläche von LDs und reguliert sehr wahrscheinlich das Wachstum von LDs. Um den Effekt der PAT-Protein-Familie auf die LD-Größenverteilung in Hepatozyten zu untersuchen, wurde im Simulationsexperiment die Menge von Adipophilin (ADRP) reduziert. Beim Knockdown von ADRP sank der TAG-Gehalt der Zelle im stationären Bereich um 60%. Die β -Oxidation, der VLDL-Export und Phospholipidsynthese blieben unverändert (Abbildung 19C-E). Des Weiteren stieg die Konzentration von DAG (Abbildung 19B grüner Bereich). Die Anzahl an großen LDs in der LD-Größenverteilung sank und die Anzahl an kleinen Tropfen stieg leicht an. Dadurch verschob sich die LD-Größenverteilung leicht hin zu kleineren LDs, d.h. durch die Reduzierung von ADRP wurden mehr kleinere LDs im Vergleich zur Referenzsimulation gebildet. Dies begründet sich in der Modellannahme, dass TIP47 das Fehlen von ADRP kompensieren kann. In murinen AML12 Zellen mit siRNA Transfektion vermittelten Knockdown von ADRP verschiebt sich die LD-Größenverteilung ebenfalls leicht nach links und es wird ein signifikanter Anstieg von TIP47 auf der Oberfläche von LDs beobachtet [60]. Bell et al. konnten ebenfalls eine Abnahme im TAG-Gehalt der Zelle feststellen und untermauern damit das Simulationsergebnis (Abbildung 19B).

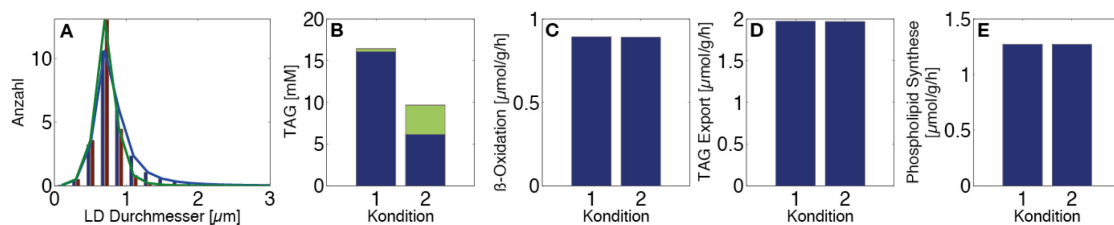


Abbildung 19: Knockdown von ADRP im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: ADRP Knockdown: Reduzierung Proteinmenge um Faktor null (grüne Kurve in A).

Im leberspezifischen Knockdown von ADRP in Mäusen wurde im Vergleich zum Wildtyp eine Abnahme des LD-Durchmesser und des TAG-Gehalt der Zelle gemessen [122].

Im Simulationsexperiment des Knockdowns von TIP47, das überwiegend mit kleinen LDs assoziiert ist, nahm der TAG-Gehalt um 60% im stationären Bereich ab (Abbildung 20B). Auch die Rate der β -Oxidation und des TAG-Exports nahmen ab. Die Phospholipidsynthese wies hingegen nur eine geringe Abnahme auf. Die Proteinmenge von TIP47 wurde mit dem Faktor von 0,1 reduziert. Das Fehlen von Tip47 auf der Oberfläche von LDs kann anscheinende durch Adipophilin teilweise ersetzt werden.

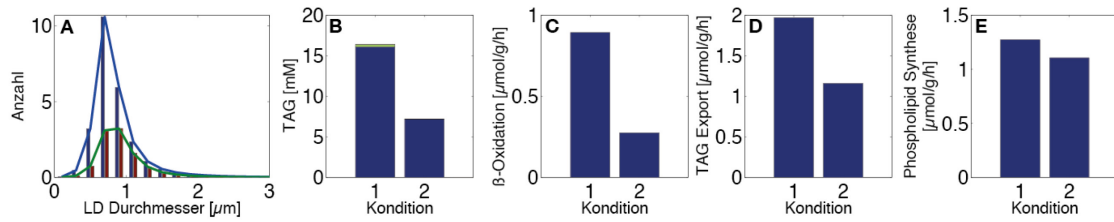


Abbildung 20: Knockdown von TIP47 im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: TIP47 Knockdown: Reduzierung der Proteinmenge um Faktor 0.1 (grüne Kurve in A).

In der LD-Größenverteilung nimmt die Anzahl kleiner LDs im Gegensatz zum Referenzzustand stark ab (Abbildung 20A). Eine Verschiebung der LD-Größenverteilung ist nicht zu beobachten.

6.2.4 Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns von CGI-5

Bei der Überexpression von CGI-58 wird der TAG-Gehalt der Zelle im stationären Bereich signifikant reduziert (Abbildung 21B). CGI-58 ist ein starker Aktivator von der ATGL und erhöht die Aktivität der Lipolyse. Analog nimmt die Anzahl der großen LDs der LD-Größenverteilung bei der Überexpression von CGI-58 im Vergleich zum Referenzzustand signifikant ab (Abbildung 21A). Im transienten Zustand von 1 Stunde ist die daraus resultierende Erhöhung der β -Oxidation und des TAG-Exports zu beobachten (Abbildung 52C-D). Die Phospholipidsynthese ändert sich hierbei kaum.

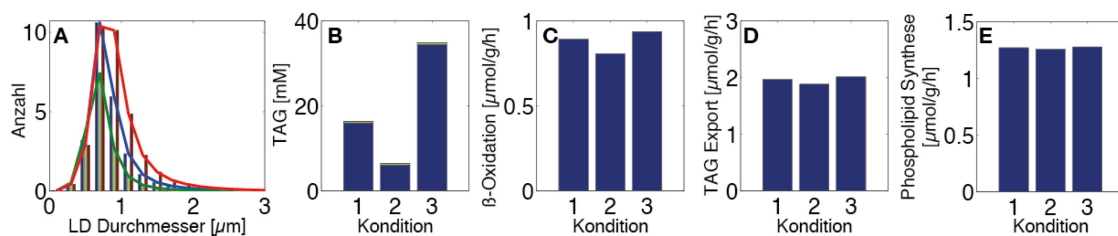


Abbildung 21: Knockdown und Überexpression von CGI-58 im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: DGAT2 Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: DGAT2 Knockdown: 0-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Im Vergleich zum Knockdown von CGI-58 nimmt aufgrund der geringeren Lipolyseaktivität der ATGL der TAG-Gehalt signifikant im stationären Zustand zu (Abbildung 21B). Die LD-Größenverteilung verschiebt sich durch die Zunahme der Anzahl von größeren LDs im Vergleich zum Referenzzustand nach rechts. Dieser Effekt hat kaum einen Einfluss auf die β -Oxidation, den TAG-Export und die Phospholipidsynthese. Diese Simulationsergebnisse stimmen mit Beobachtungen in CGI-58 defizienten Mäusen überein [117].

6.2.5 Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns von FSP27

Die Überexpression von FSP27 resultiert in einer Zunahme des TAG-Gehalts der Zelle aufgrund der erhöhten Fusionsrate zwischen LDs im stationären Zustand (Abbildung 22B). Dadurch entstehen vermehrt größere LDs und die LD-Größenverteilung verschiebt sich leicht hin zu größeren LDs (Abbildung 22A). Bei erhöhter Fusion von LDs werden die β -Oxidation und der TAG-Export leicht reduziert. Die Phospholipidsynthese bleibt bei der Erhöhung oder Reduzierung der Proteinmenge von FSP27 unverändert (Abbildung 22E). In der Simulation hat der Knockdown von FSP27 kaum einen Effekt auf die β -Oxidation und den TAG-Export. Es ist aber eine geringe Zunahme von kleinen LDs und eine Abnahme des TAG-Gehalts zu beobachten.

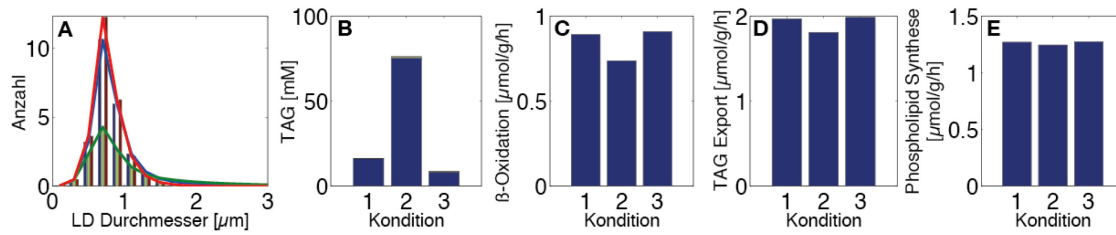


Abbildung 22: Überexpression und Knockdown von FSP27 im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: FSP27 Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: FSP27 Knockdown: 0.1-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Im Simulationsergebnis des transienten Zustands ist die LD-Größenverteilung bei der Überexpression von FSP27 in eine Fraktion mit vielen kleinen LDs und eine mit größeren LDs unterteilt (Abbildung 53A). Die signifikante Abnahme des TAG-Pools nach dem Knockdown von FSP27 in Hepatozyten von adipösen Mäusen konnte auch Xu et al. nachweisen [123].

6.2.6 Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns der HSL

Die hormon-sensitive Lipase ist mit der Oberfläche von LDs assoziiert und hydrolysiert FFSS von TAG und DAG, wobei die Präferenz für DAG erheblich höher ist. In vivo wurde die lipolytische Funktion der HSL in der überwiegenden Hydrolyse von DAG gemessen [9, 124]. Des Weiteren wird die HSL durch die reversible Phosphorylierung reguliert. Bei der Überexpression der HSL steigt die Lipolyse und der TAG-Pool der Zelle sinkt (Abbildung 23B). Der Knockdown resultiert in eine Erhöhung des TAG und DAG-Gehalts im stationären Bereich.

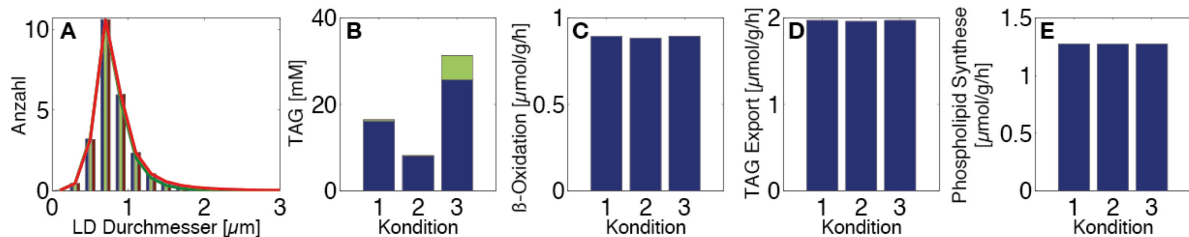


Abbildung 23: Überexpression und Knockdown der hormon-sensitiven Lipase im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: HSL Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: MTP-Knockdown: 10-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Im transienten Zustand ist nach 1h bei der Überexpression der HSL eine Zunahme der β -Oxidation und des TAG-Exports zu erkennen, die auf die erhöhte lipolytische Aktivität der Zelle zurückzuführen ist (Abbildung 54C-D). Im Simulationsexperiment hat die Überexpression und der Knockdowns der HSL im stationären wie auch im transienten Zustand keinen Einfluss auf

den TAG-Export, die β -Oxidation und der Phospholipidsynthese. Das konnte auch Reid et al [115] in der Überexpression der HSL in Mäusen beobachten.

6.2.7 Auswirkung der Überexpression und des Knockdowns der ATGL

Bei Überexpression der ATGL werden der TAG-Gehalt und die Anzahl an LDs $>0,8 \mu\text{m}$ durch die erhöhte Aktivität der Lipolyse im stationären Zustand herabgesetzt (Abbildung 24 A-B). Auch bei Reid et al. resultierte die Überexpression der ATGL in einen verringerten zellulären TAG-Gehalt und in einer erhöhten β -Oxidation [115]. Die leichte Verschiebung der LD-Größenverteilung hin zu kleineren LDs wurde ebenfalls bei der Überexpression der ATGL in HeLa-Zellen nach der Inkubation mit Ölsäure beobachtet [114]. Beim Knockdown der ATGL nimmt der TAG-Gehalt der Zelle um fast 50% und die Anzahl an LDs $>0,8 \mu\text{m}$ zu. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen in Mäusen mit einem Adenovirus erzeugten Knockdown der ATGL überein [113]. Im stationären Bereich ändern sich der TAG-Export und die Phospholipidsynthese kaum bis gar nicht.

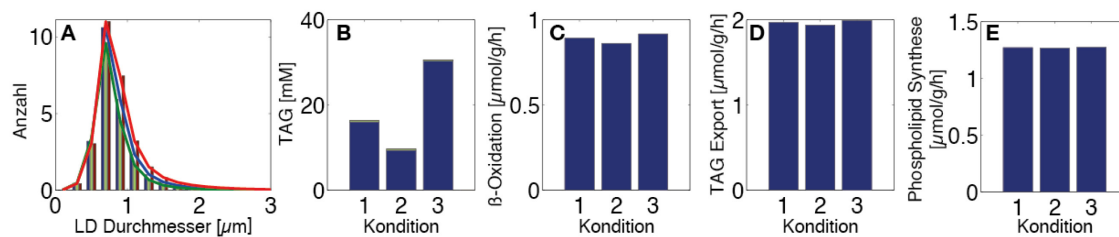


Abbildung 24: Überexpression und Knockdown der ATGL im stationären Zustand. A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt (blau), zellulärer DAG-Gehalt (grün), C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: ATGL Überexpression: 2-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: ATGL-Knockdown: 0,5-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Im transienten Zustand steigt die β -Oxidation durch die vermehrte lipolytische Spaltung von TAG bei der Überexpression der ATGL signifikant an (Abbildung 55C). Durch einen höheren TAG-Umsatz nimmt auch der TAG-Export zu (Abbildung 55D). Einen signifikanten Einfluss der Überexpression und des Knockdowns der ATGL im transienten Zustand zeigt das Simulationsergebnis nicht. Ein Knockdown der ATGL in Mäusen resultierte in eine Steatose und in eine Zunahme des TAG-Gehalts [113]. In primären Hepatozyten verursachte der Knockdown die Abnahme der Hydrolyse von TAG. Die LD-Größenverteilung verschob sich durch die TAG Zunahme hin zu größeren LDs [114].

6.3 Modellanwendung

6.3.1 Quantifizierung der pro-steatotischen und anti-steatotischen Effekte individueller molekularer Prozesse

Um den relativen regulatorischen Einfluss von einzelnen Prozessen, die im TAG und LD-Metabolismus involviert sind, auf den zellulären TAG-Gehalt der Zelle zu untersuchen, wurde eine Kontrollanalyse durchgeführt. Mit Hilfe der Kontrollanalyse wurden die pro-steatotischen und anti-steatotischen Effekte untersucht, die durch die Aktivierung und Inhibition einzelner molekularer Prozesse impliziert wurden. Dabei wurde die maximale Aktivität der 36 molekularen Prozesse des Modells variiert. Der Einfluss auf den TAG-Gehalt und der LD-Größenverteilung wurde mit einer festen externen FFS-Konzentration untersucht. Zu diesem Zweck wurde die maximale Aktivität eines jeden molekularen Prozesses zu 10% erhöht und herabgesetzt und die stationäre LD-Größenverteilung mit einer externen Konzentration von 0,5 mM FFSs berechnet. Das Ergebnis dieser Kontrollanalyse ist in Abbildung 25 veranschaulicht.

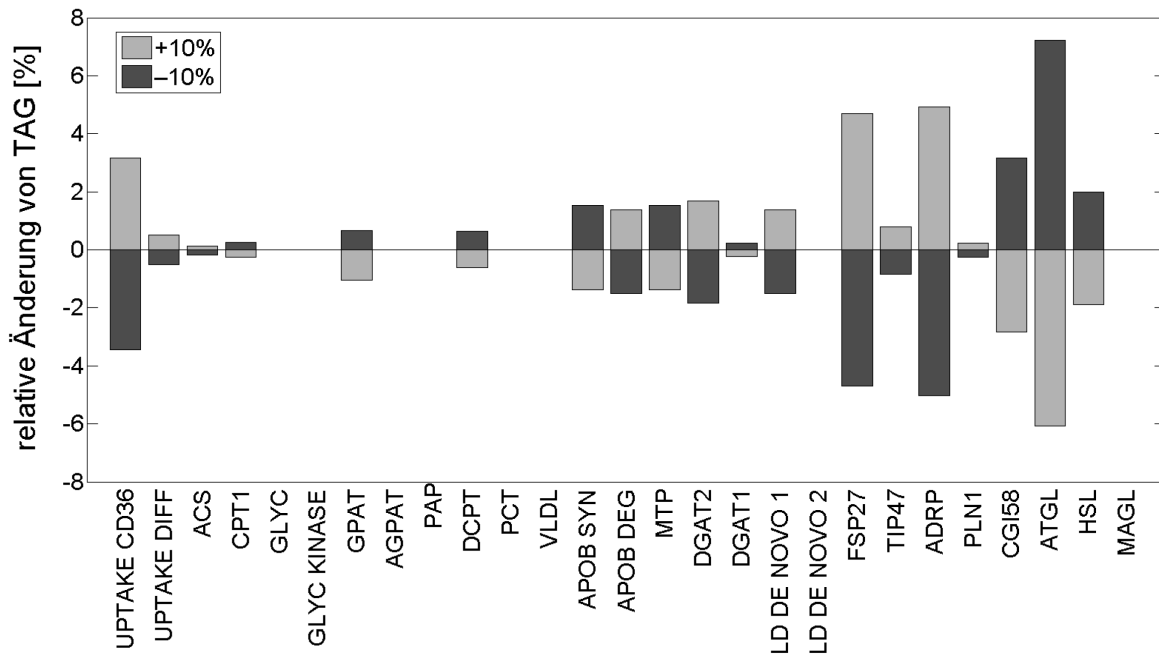


Abbildung 25: Relative Änderung des zellulären TAG-Gehalts durch die Änderung der maximalen Aktivität der individuellen Prozesse von $\pm 10\%$.

Das Modell sagt einen signifikanten Einfluss von allen ROPs voraus, wobei ATGL den größten Einfluss ausübt. Ebenfalls ist die Aufnahme von FFSs in die Zelle ein wichtiger Kontrollschritt. Die Enzyme AGPAT und PAP der TAG Biosynthese üben nur einen sehr geringen Einfluss aus. Im Gegensatz zu DGAT1 und DGAT2, die den letzten Schritt der TAG-Biosynthese katalysieren und mit DCPT um den gemeinsamen Metabolit DAG konkurrieren. Die Ergebnisse der Kontrollanalyse stimmen mit experimentellen Ergebnissen überein. Die Expression von CD36, ein wichtiger Transporter von FFSs in die Zelle, ist in Tiermodellen mit NAFLD und in Menschen mit NAFLD erhöht [125, 126]. Die Expression von ATGL ist in der Leber von

Patienten mit einer Lebersteatose verringert, dass zeigt auch das Simulationsergebnis der Überexpression der ATGL von 10% mit einem deutlichen Abnehmen der relativen Änderung an TAG (Abbildung 25)[127]. Ebenfalls ist FSP27 in steatotischen Lebern stark erhöht [128]. In Mäusen mit einer CGI58-Herunterregulation führte dies zu einer Steatose [129, 130]. Bei der Überexpression der HSL wurde in Mäusen eine Reduzierung des TAG-Gehalts in der Leber von 40-60% festgestellt [115]. Immunhistologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass in Hepatozyten von Patienten mit einer Fettleber die Expression von ADRP im Vergleich zur gesunden Leber erhöht ist [131]. Bei der Änderung der maximalen Aktivität von ADRP zeigt sich im Simulationsergebnis ebenfalls eine Erhöhung der relativen Änderung von TAG im Hepatozyten.

6.3.2 Änderung der Größenverteilungen von Lipidtropfen in TAG-akkumulierenden PLC-Zellen

Mehrere Studien haben demonstriert, dass hohe Konzentrationen von FFSs im Medium zu einer starken zellulären Akkumulation von TAG in Hepatozyten innerhalb weniger Stunden führen, wobei sich die Größe und Anzahl der LDs erhöht. Jedoch wurde die dynamische Veränderung in der LD-Größenverteilung während der TAG-Akkumulation nicht gemessen. Hierzu wurden nun Experimente mit humanen Hepatomzellen (PLC) gemacht, die Abschnitt 5.1.1 näher erläutert sind. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Verschiebung des Median der LD-Größenverteilung nach rechts ab dem 6-Stunden-Wert hin zu größeren LDs mit zunehmender Inkubationszeit. Das kinetische Modell reproduziert die beobachteten zeitlichen Änderungen in der Form der LD-Größenverteilung bis zu dem Zeitpunkt von 6 Stunden. Es kann aber nicht die Verschiebung des Medianes ab dem 6 Stunden Wert nach rechts reproduzieren, die das komplette Verschwinden von kleinen Lipidtropfen und die Verschiebung der LD Verteilung hin zu großen LDs nach 24 Stunden beinhaltet. Die Verschiebung von kleinen hin zum großen LDs ist physiologisch plausibel wie auch der TAG-Gehalt von einem LD mit Radius R ist proportional zu R^3 : Ein großer LD mit Radius $R = 3 \mu\text{m}$ speichert genauso viel Menge an TAG wie 27 kleine LDs mit Radius $R = 1 \mu\text{m}$.

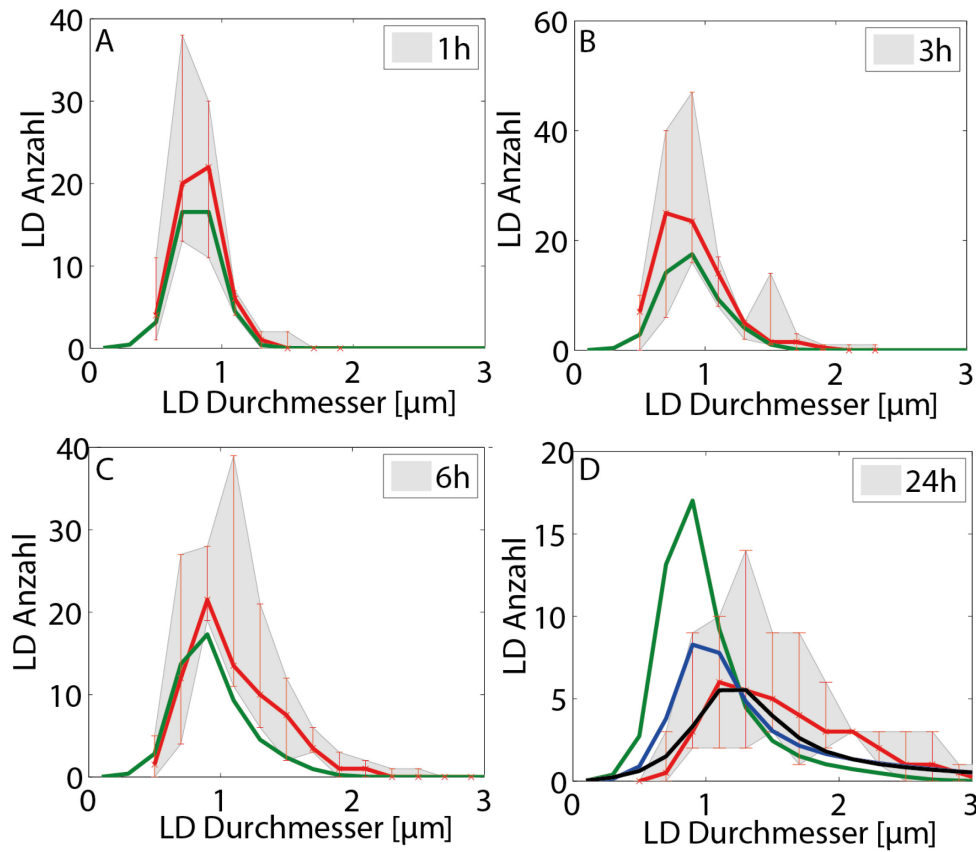


Abbildung 26: Gemessene und simulierte LD-Größenverteilungen in PLC-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. PLC-Zellen wurden mit 0,5 mM Palmitinsäure/Ölsäure-Gemisch für die Zeitpunkte 1 h, 3 h, 6 h und 24 h inkubiert. Die Anzahl und Größe der Lipidtropfen wurde in 73 PLC-Zellen mit der NIS-Elements-Software analysiert und der Median der Größenverteilung (rote Kurven) und der Bereich von 25% Percentilen (graue Fläche) errechnet. Grüne Kurven: simulierte LD-Größenverteilung bei vorgegebenen Proteinabweichungen. Blaue Kurven: simulierte LD-Größenverteilung mit dreifacher Erhöhung der DGAT2 Aktivität und achtfacher Erhöhung der FSP27 Aktivität innerhalb von 24 Stunden. Schwarze Kurve: simulierte LD-Größenverteilung mit dreifacher Erhöhung der DGAT2 Aktivität, achtfacher Erhöhung von FSP27 und einer veränderten DGAT2 Auffüllungskinetik (dreifache Erhöhung des Parameters k_{rld}^n , um die Auffüllung von großen LDs mit TAG durch DGAT2 zu zulassen innerhalb von 24 Stunden.

Die Änderungen von Proteinabweichungen innerhalb von 24 Stunden Inkubation können die bevorzugte Bildung von großen LDs erklären. Tatsächlich wurde die Akkumulation von Lipiden in Hepatozyten begleitend durch die signifikante Änderung der Häufigkeit von PAT und CIDE Proteinen festgestellt [42, 128, 132], die hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und CREBH vermittelt wird. Durch die Änderung des Expressionsniveaus der Proteine, die den größten pro-lipogenetischen Effekt haben, kann der Hepatozyt seine TAG-Speicherkapazität an eine höhere TAG-Beladung anpassen. Zeitliche Änderungen der DGAT2 und FSP27 Aktivität, die sich aus der Kontrollanalyse als die stärksten Einflüsse auf die LD-Größenverteilungen ergaben, wurden in das kinetische Modell miteinbezogen. Diese Modellanpassung brachte die simulierte LD-Größenverteilung nur leicht der experimentellen Daten näher (Abbildung 26, blaue Kurven). Zufällige Variationen der Aktivität anderer ROPs verbesserte das Ergebnis nicht. Daher wurde vermutet, dass die Änderung einer der beiden alternativen Mechanismen im Modell das Verschwinden von kleinen LDs hervorrufen kann. Das Erhöhen der LD-Größe und damit

das Verschwinden von kleinen LDs kann entweder durch zusätzliches TAG-Auffüllen von schon existierenden LDs durch DGAT2 oder durch den Transfer von TAG von kleinen zu größeren LDs durch FSP27 realisiert werden. Die Erhöhung von FSP27 konnte nicht die beobachtete LD-Größenverteilung reproduzieren. Daher wird vermutet, dass die Änderung der LD-Größeneinstellung durch DGAT2 innerhalb der 24 Stunden FFS Inkubation auftritt. In der Tat konnte eine sehr gute Übereinstimmung zwischen beobachteter und simulierter Verteilung nach 24 h erreicht werden, nachdem der Parameter k_{rld}^n erhöht wurde, der die Größe von LDs berechnet und die Auffüllung mit TAG durch DGAT2 direkt beeinflusst (schwarze Kurve Abbildung 26D). Der kinetische Modellparameter k_{rld}^n fasst zahlreiche elementare Schritte zusammen, die in der Rekrutierung von LDs zur ER-Membran und in der Assoziation mit DGAT2 von angedockten LDs involviert sind. Daher ist es schwierig eine klare mechanistische Erklärung für die vermeintliche Änderung der Kinetik von der Entwicklung der LDs abzugeben. Mit Hilfe der Gefrierbruch-Replika-Immun-gold-Markierungstechnik (FRIL) wurde der Beweis geliefert, dass wachsende LDs an speziellen Domänen des ERs vorhanden sind [133]. Dort werden sie von der ER-Membran in Form eines Eierbeckers umgeben. Wie diese Andockstellen an der ER-Membran gebildet werden oder warum sie unter den Bedingungen der FFS Inkubation fähig sind mit großen LDs zu assoziieren, bleibt auch durch die Modellsimulationen unklar. Ultrastrukturelle Veränderungen des ERs spielen anscheinend eine wichtige Rolle bei der Überlastung des ERs von CHO Zellen. Bei einer durch Palmitinsäure induzierte sehr schnelle Synthese von Neutrallipiden wurde das ER erheblich erweitert und die Morphologie des ERs innerhalb weniger Stunden beeinträchtigt [134].

6.3.3 Heterogenität der Größenverteilungen von Lipidtropfen in TAG-akkumulierenden primären humanen Hepatozyten

In einem weiteren Experiment wurden aus einer humanen Leber primäre Hepatozyten isoliert und für 24 Stunden in 0,5 mM Palmitinsäure/Ölsäure-Gemisch inkubiert. Die Ergebnisse der verschiedenen humanen Lebern sind in Abschnitt 5.1.2 dargestellt. Eine sehr sorgfältige Analyse der Anzahl und Größe der LDs in 27 einzelnen Zellen einer humanen Leber nach 24 Stunden Verfettung wurde durchgeführt (Abbildung 27A). Die Ergebnisse weisen große Abweichungen in den LD-Größenverteilungen auf und deuten auf eine beträchtliche Heterogenität im Expressionslevel der regulatorischen Schlüsselproteine hin. Die dazugehörige mittlere LD-Größenverteilung mit 25% Perzentilen ist in Abbildung 27B (rote Kurve) dargestellt. Um potentielle Muster von Proteinexpressionen zu finden, die zu den beobachteten Variabilitäten der LD-Größenverteilung führen, wurde das kinetische Modell benutzt. Es war nötig einige Modellparameter zu kalibrieren, die auf den Ratten Hepatozyten parametrisiert wurden, um den Median der LD-Größenverteilung nach 24 Stunden Inkubation mit FFS zu rekapitulieren (schwarze Kurve Abbildung 26D). Dazu wurden die Modellparameter im Referenzmodell

geändert: DGAT2 (10-fach), FFS Aufnahme CD36 (10-fach), k_{rd}^n (0,5-fach), ATGL (0,005-fach) und FSP27 (0,5-fach).

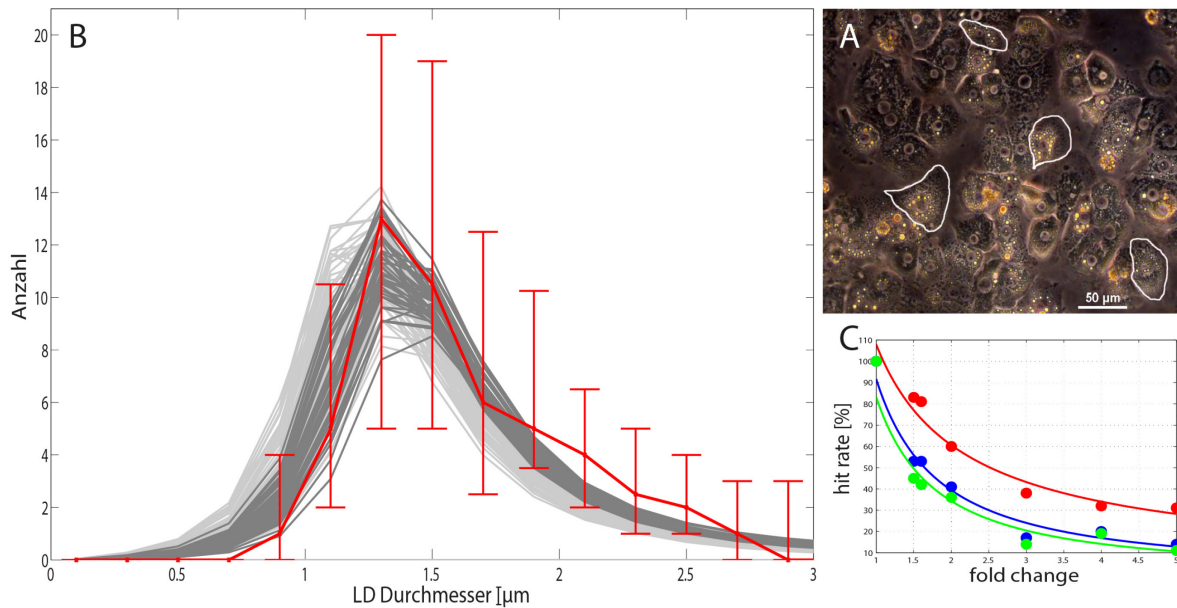


Abbildung 27: Heterogenität des TAG-Levels und der LD-Größenverteilungen in einzelnen humanen Hepatozyten. A: Aufnahme von konfluenten humanen Hepatozyten gemacht mit einem Phasen-Kontrast-Lichtmikroskop. Vier einzelne Hepatozyten sind mit weißer Umrandung markiert. B: Median der LD-Größenverteilung (dicke rote Linie) und Bereiche der Variabilität (=25%-Quartile, d.h. 25% der Werte liegen unterhalb und oberhalb) nach der Auswertung der LD-Größenverteilungen der einzelnen 27 Zellen. Dunkelgraue Kurven markieren die simulierten LD-Größenverteilungen (über 50% von allen Kurven), die in die 11 variablen Bereiche fallen definiert durch experimentelle Daten. Hellgraue Kurven markieren die Kurven, die das Trefferkriterium nicht erfüllen. C: Fraktion der simulierten LD-Größenverteilungen, die in 5 (rote Punkte), 8 (blaue Punkte) oder 11 (=alle) (grüne Punkte) Bereiche der Variabilität fallen, die durch 25% der Perzentilen der Daten definiert mit verschiedenen maximalen Änderungsfaktoren definiert sind.

Daraufhin wurde die Menge von (1) der FFS Aufnahme CD36, (2) DAGT1, (3) DGAT2, (4) FSP27, (5) ADRP und (6) ATGL, die in der Kontrollanalyse den größten Einfluss auf die LD-Größenverteilung hatten, zufällig variiert. Der maximal erlaubte Änderungsfaktor in der Expression von diesen Proteinen wurde zwischen 1 und 5 variiert und es wurden LD-Größenverteilungen mit 100 zufälligen generierten Mengen von Proteinmustern berechnet. Des Weiteren wurde geprüft, ob die berechneten LD-Größenverteilungen statistisch zu den beobachteten LD-Größenverteilungen passen. Dazu wurde eine simulierte Verteilung als „Treffer“ definiert, wenn die Besetzung der zuvor definierten Anzahl an Größenklassen innerhalb des Bereiches verblieb, der durch das 25%-Perzentil der experimentellen Verteilungen festgelegt war. Die Anzahl der Größenklassen wurde zwischen 5 und 11 variiert, die das Treffer-Kriterium erfüllen. Das maximale zufällige Änderungsfaktor der Aktivitäten wurde zwischen 1 und 5 variiert und die relative Fraktion der Treffer überprüft (Abbildung 27C). Die Analyse zeigt, dass abhängig von der Anzahl der Größenklassen forciert wurde, dass Trefferkriterium zu erfüllen. Ein geringer Änderungsfaktor von 1,4-1,9 brachte die Fraktion von über 50% Treffer ein und war ausreichend

die Streuung experimenteller Daten wiederzugeben (Abbildung 27C). In Abbildung 27B wird der Satz der zufällig generierten LD-Größenverteilungen mit maximalen Genexpressionsänderungen des Änderungsfaktors von 1,5 veranschaulicht, der das Trefferkriterium von über 50% der Kurven erfüllt und innerhalb der 25%-Perzentilen von allen 11 Größenklassen liegt (Abbildung 27B dunkelgraue Kurven).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Vergleich von experimentell bestimmten und simulierten LD-Größenverteilungen in zwei unterschiedlichen Typen von Leberzellen bei einer Inkubation mit FFSs die Vermutung nahelegt, dass die zeitliche TAG-Speicherung abhängig von der sensitiven adaptiven Genexpression der pro-lipogenetischen Enzyme und der ROPs ist. Die adaptive Genexpression der pro-lipogenetischen Enzyme und der ROPs variiert wahrscheinlich erheblich zwischen einzelnen Zellen.

6.3.4 In-vivo-Dynamik von Lipidtropfen im Tagesverlauf

Basierend auf den Ergebnissen mit isolierten Leberzellen wurden mit dem kinetischen Modell die Änderungen im TAG-Metabolismus der Rattenleber abhängig von tageszeitlichen Schwankungen von Glukose, FFSs, Insulin und Glukagon des Blutplasmas simuliert (siehe Abbildung 28). Die Plasmaprofile der Hormone und Metabolite für die gefütterte und gefastete Ratte wurden der Veröffentlichung [96] entnommen.

Die zufällig generierten Mengenprofile der sechs regulatorischen Schlüsselproteine, die die Variabilität der LD-Größenverteilung in isolierten humanen Hepatozyten erklären, wurden nun für die Berechnung der LD-Größenverteilung im Tagesverlauf von 24 Stunden verwendet. Es wurde für jede Stunde die entsprechende LD-Größenverteilung der 100 zufälligen generierten Proteinmengen berechnet (siehe Abbildung 28B).

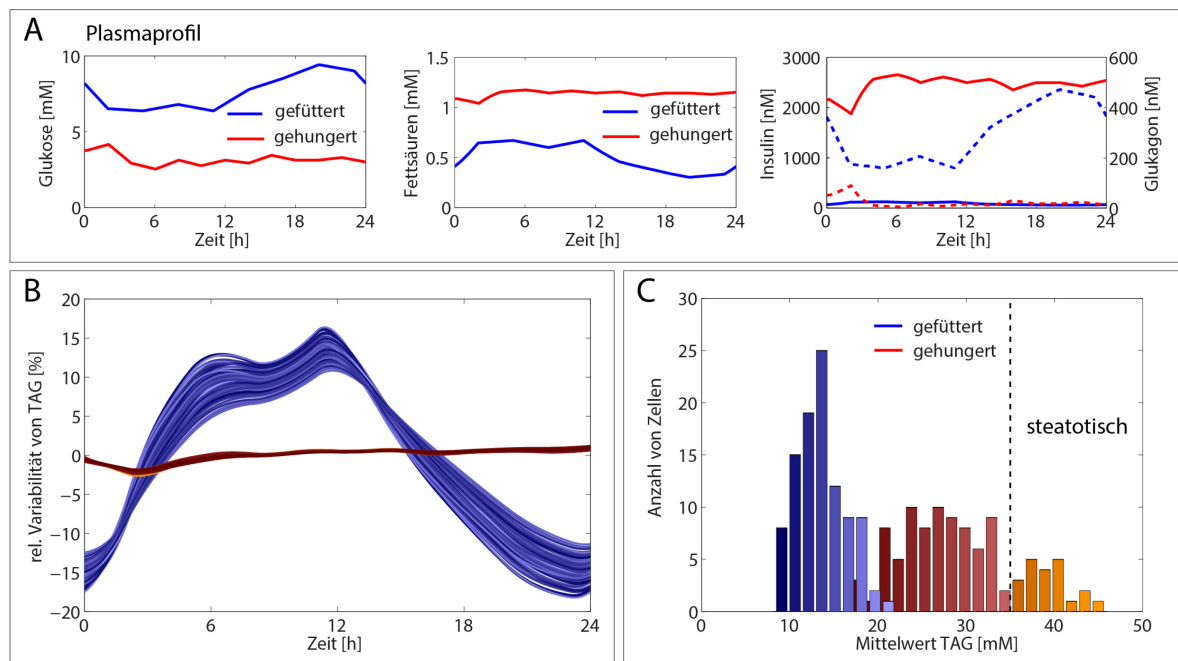


Abbildung 28: Simuliertes Tagesprofil des TAG-Gehalts von Rattenhepatozyten in vivo. A: 24 Stunden Konzentrationsprofil von Glukose, FFSs, Insulin und Glukagon der gefütterten und gefasteten Ratte. B: Relative Variabilität des zellulären TAG-Gehalts bezüglich des 24 Stunden Mittelwerts. Die Kurven wurden mit zufälligen variierten Aktivitäten von CD36 (Aufnahme von FFSs), DGAT1, DGAT2, FSP27, ADRP und der ATGL mit einem maximalen Änderungsfaktor von 1,5 berechnet. Die dunkleren Farbnuancen bedeuten einen geringeren absoluten TAG-Gehalt abgebildet in C. Zellen mit einem niedrigen TAG-Gehalt zeigen eine geringere tageszeitliche TAG Variabilität als Zellen mit einem hohem TAG-Gehalt. C: Häufigkeitsverteilung des mittleren absoluten zellulären TAG-Gehalts (= 24h Mittelwert). Zellen mit einem TAG-Level von über 35 mM werden als zunehmend steatotisch bezeichnet (gestrichelte Linie).

Die relative Änderung des zellulären TAG-Gehalts von individuellen Hepatozyten schwankte in den gefütterten Ratten um $\pm 15\%$ vom niedrigsten bis zum höchsten Wert bei 0h und 12h. Zellen mit dem niedrigsten absoluten TAG-Gehalt von über 10 mM (hellblaue Kurven und Säulen in Abbildung 28B, C) zeigen eine größere Variabilität im Tagesverlauf als Zellen mit einem hohen TAG-Gehalt von über 20 mM (dunkelblaue Kurven und Säulen). Im Vergleich dazu zeigt sich zum relativen TAG-Gehalt in gefasteten Rattenhepatozyten (bei 48 h als Hungerperiode) nur eine geringe Veränderung von wenigen Prozenten.

Im gefasteten Zustand ist das FFS Level und das Glukagonlevel konstant höher im Vergleich zum gefütterten Zustand (Abbildung 28A). Die absoluten TAG-Levels können Werte von über 40 mM erreichen. Das bedeutet, dass einige Zelle im Hungerzustand als steatotisch eingestuft werden können.

7 Diskussion und Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein umfassendes mathematisches Modell entwickelt, dass viele Einzelnachweise aus zahlreichen Publikationen in ein konsistentes Bild vereinigt und die mechanistische Erklärung für diverse Literaturergebnisse im TAG-Metabolismus und in der Dynamik von LDs in der Leber sein kann. In primären humanen Hepatozyten und Hepatomzellen PLC konnte die heterogene Verfettung von Hepatozyten und die zeitabhängige LD-Größenverteilung nach der Inkubation mit FFSs gezeigt werden. Nicht nur mit Literaturdaten, sondern auch mit Daten aus eigenen Experimenten konnte das Modell überprüft werden. Das kinetische Modell kann nun helfen zentrale regulatorische Prozesse zu klären und Zielstrukturen für neue Medikamente zu finden, die bei übermäßiger TAG-Akkumulation in der Leber z.B. der Steatose entgegenwirken.

In Verfettungsexperimenten mit PLC-Zellen und primären humanen Leberzellen wurde eine starke Heterogenität der LD-Größenverteilung und des Gesamt TAG-Gehalts innerhalb der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inkubation mit FFSs festgestellt. Diese Beobachtungen stimmen auch mit früheren Ergebnissen anderer Arbeiten überein [29, 60]. Die detaillierten Beobachtungen der zeitabhängigen Änderung der LD-Größenverteilung in Hepatozyten ist jedoch neu. Herms et al. entdeckten ebenfalls eine deutliche Heterogenität der Lipidtropfen in murinen primären Hepatozyten und beobachteten eine deutliche Verschiebung der LD-Größenverteilung hin zu größeren LDs [135]. Die Anzahl und Größe der Lipidtropfen variierten ebenfalls stark in AML12 Zellen nach der Inkubation mit Fettsäuren für 24 Stunden. In beiden *in vitro* Studien wurde die Verschiebung der LD-Größenverteilung nach Inkubation mit FFSs von kleinen LDs hin zu größeren LDs nach der detaillierten Quantifizierung der LDs belegt. Die starke Heterogenität der LD-Größenverteilung lässt sich womöglich darauf zurückführen, dass Zellen bei der Isolierung der primären humanen Hepatozyten aus verschiedenen Bereichen der Leber entnommen wurden, die aufgrund der Zonierung der Leber unterschiedliche Mengen von Metaboliten und folglich verschiedene Aktivitäten der Proteine besaßen und somit auch im Metabolismus variierten. In morphometrischen und histochemischen Studien wurde gezeigt, dass periportale und perivenöse Hepatozyten sich in ihrem Enzymgehalt und der subzellulären Struktur unterscheiden [136, 137]. In *in situ* Lipidomikanalysen mit der Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie wurden in Leberbiopsien von Patienten mit nicht-alkoholischer Lebererkrankung die unterschiedliche Lipidlokalisation und LD-Akkumulation abhängig von der Zonierung der Leber beobachtet [138]. Auch bei Apolipoprotein ApoE zeigte sich in Genexpressionsstudien des Lipidmetabolismus eine bevorzugte Lokalisation in der Leber von Mäusen und Ratten [139, 140]. In humanen Leberbiopsien wurde auch in Lebern mit chronischer Hepatitis C eine starke Heterogenität zwischen Hepatozyten aus verschiedenen Zonierungsbereichen der Leber festgestellt [141]. In 3T3-L1 Vorläuferfettzellen wurde eine sehr unterschiedliche Lipidtropfenverteilung innerhalb der Zellen beobachtet [142]. Die Dynamik von

LD-Größenverteilungen konnte in verschiedenen Zeitreihen in Hepatozyten durch die Fettsäurebeladung detailliert gezeigt werden und gibt neue Einblicke in der TAG-Speicherung.

Das mathematische Modell wurde auf der Basis zahlreicher experimenteller Arbeiten aus Publikationen parametrisiert und validiert. Es ist das erste kinetische Modell, das den TAG- und LD-Metabolismus beschreibt.

In der TAG-Biosynthese konkurrieren gemäß der Modellannahme DGAT1 und DGAT2 um den gemeinsamen DAG-Pool in der ER-Membran. Dadurch wird bei der Erhöhung der DGAT1-Aktivität die DAG-Verfügbarkeit für DGAT2 und somit das Auffüllen kleiner LDs mit TAG, d.h. das Wachstum von LDs reduziert. Im stationären und transienten Bereich zeigte die Modellsimulation bei der Überexpression von DGAT1, d.h. eine Erhöhung der Aktivität von DGAT1 und eine Zunahme der Anzahl kleiner LDs und des TAG-Exports auf. Die LD-Größenverteilung verschiebt sich dadurch hin zu kleinen LDs. Diese Beobachtungen stimmen mit experimentellen Ergebnissen aus in-vivo- und in-vitro-Studien überein [29, 102, 105]. Der TAG-Gehalt der Simulation zeigte allerdings im Vergleich zu experimentellen Daten keine Übereinstimmung. Bei der Überexpression von DGAT1 steigt der TAG-Gehalt in der Simulation leicht an, experimentelle Ergebnisse beobachten dagegen eine Abnahme [29, 102, 103]. In diesem Zusammenhang wird die Hypothese aufgestellt, dass diese Diskrepanz durch adaptive/kompensierende Änderungen in anderen Proteinmengen hervorgerufen wird. Auch Yamazaki et al. sehen diesen Widerspruch kontrovers und vermuten ebenfalls, dass adaptive Mechanismen zusätzlich involviert sind [102]. Eine mögliche Kompensation von DAGT1 durch DGAT2 und umgekehrt könnte eine Erklärung sein, dass bei dem Fehlen eines der beiden Enzyme die Synthese von TAG aufrechterhalten wird.

In murinen Hepatozyten wurden nach der Inaktivierung von DGAT2 eine signifikante Erhöhung der Phospholipidsynthese und die Bildung von kleinen LDs beobachtet. Im Vergleich zur DGAT1 resultierte eine Hemmung in das Wachstum von LDs [107]. Die unterschiedlichen Effekte von DGAT1 und DGAT2 auf die Morphologie der LDs in primären murinen Hepatozyten stimmen mit Studien von RH7777-Rattenhepatozyten und den Modellsimulationen gut überein. Auch bei Stone et al. führte die Überexpression von DGAT1 zur Bildung von kleinen LDs in der Zellperipherie und in DGAT2 überexprimierenden Zellen zu mehr großen LDs [105]. Auch wurden ähnliche Effekte in anderen Spezies gefunden. So führte in *Drosophila* Zellen die Überexpression von DGAT1 zu kleinen LDs und die von DGAT2 zu großen LDs [29].

Die verschiedenen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien unterscheiden sich aber auch in der Interpretation der Resultate in Bezug auf die Verteilung der DGATs innerhalb der ER-Membran, das auf unterschiedliche Tiermodelle und verschiedene experimentelle Bedingungen zurückzuführen ist. In Studien führte eine kurze Überexpression von DGAT1 zu einer Erhöhung des TAG-Gehalts und zur unveränderten VLDL-Sekretion [103]. Nach der Modellannahme, dass

DGAT1 bevorzugt TAG für den TAG-Export synthetisiert, kann in der Modellsimulation der Überexpression von DGAT1 der TAG-Gehalt nicht stark ansteigen. Das Simulationsergebnis zeigt hier einen signifikanten Anstieg des TAG-Exports, das mit Studien in Rattenhepatozyten und murinen Hepatozyten übereinstimmt [102, 121].

In Studien mit fettleibigen Mäusen konnte eine DGAT2-Verringerung eine Insulin Resistenz, Lebersteatose und Hyperlipidämie durch Antisense-Oligonukleotide verbessern [108, 143]. Dabei wurde eine erhöhte β -Oxidation bei der Hemmung der DGAT2 kontrovers zur Modellsimulation beobachtet. Es wird vermutet, dass bei der Hemmung der DGAT2 und einer erhöhten Phospholipidsynthese die Zelle versucht synthetisiertes TAG in viele kleine LDs zu speichern. Der neue Ansatz ist im Modell, dass DGAT2 sich fraktionell auf dem ER und der schon vorhandenen LDs verteilt. DGAT2 synthetisiert TAG in der ER-Membran und füllt schon vorhandene LDs mit TAG auf und nimmt somit zwei Funktionen im Modell ein. Die Verteilung von DGAT2 zwischen dem ER und der unterschiedlichen LD Klassen LD^n hängen von der LD Anzahl in jeder Fraktion num_{LD^n} und dem Radius r_{ld} von den LDs ab (siehe Abschnitt 0). Die Modellannahmen und Ergebnisse stimmen mit vielen experimentellen Arbeiten überein und sind plausibel. Die Klärung der Funktion von DGAT1 und DGAT2 im Lipidmetabolismus und in der VLDL-Sekretion und ihrer Topologie benötigt aber weiterer Experimente und ist nicht abschließend geklärt.

Aufgrund der zentralen Rolle des zellulären TAG-Metabolismus bei Adipositas, Lebersteatose, Diabetes und Myopathie [144] zielt die derzeitige experimentelle Forschung auf die Klärung der molekularen Mechanismen ab, die den zellulären TAG-Level in der Zelle kontrollieren. Erst kürzlich wurden einige zentrale Akteure wie z.B. das CIDE-Protein FSP27 identifiziert und man kann erwarten, dass in der Zukunft noch weitere regulatorische Proteine entdeckt werden. Das Wachstum von LDs wird im Modell durch das Auffüllen schon vorhandener LDs durch DGAT2 und durch die Fusion zweier LDs mit unterschiedlicher Größe mit einer Fusionsrate ermöglicht. Dabei ist die Fusion abhängig von der Menge an FSP27, das mit Oberfläche der LDs assoziiert ist. Im Simulationsergebnis der Hemmung von FSP27 konnte wie in FSP27-defizienten Mäusen [28] die Abnahme des zellulären TAG-Gehalts und die Verschiebung der LD-Größenverteilung nach rechts beobachtet werden.

Das mikrosomale Transferprotein ist für den Aufbau von Lipoproteinen essentiell und wurde in Hepatozyten und Adipozyten nachgewiesen. Dennoch sind Literaturdaten mit leberspezifischer Überexpression von MTP rare. In Übereinstimmung mit der Modellsimulation konnte Tietge et al. in der Überexpression von MTP mit einem MTP exprimierenden rekombinanten Adenovirus eine signifikante Erhöhung der hepatischen TAG Sekretion in Mäusen beobachten [109]. Durch die Zunahme des TAG-Exports kann die Zelle weniger TAG speichern. Daher kann aufgrund des Modellergebnisses die Hypothese aufgestellt werden, dass bei der Überexpression von MTP

in Hepatozyten die Anzahl der LDs, der zelluläre TAG-Gehalt, die β -Oxidation und die Phospholipidsynthese abnehmen.

Bemerkenswert ist, dass das Ausmaß der Fettspeicherung in LDs nicht stringent mit dem Grad der FFS-Überladung folgt und erstaunlicherweise eine Zell zu Zell Heterogenität zeigt [135, 145]. Eine mögliche Erklärung könnte die Variabilität in der Expression von metabolischen Enzymen sein, die im Lipidmetabolismus involviert sind. Auch die Variabilität von regulatorischen Oberflächenproteinen, die die Bildung, das Wachstum und die Degradation von LDs kontrollieren, kann ein Grund dafür sein. Zu den am besten untersuchtesten ROPs gehört die PAT- und CIDE-Familie. Die ROPs haben einen entscheidenden Einfluss auf die De-novo-Synthese im Modell (siehe Abschnitt 9.3.7). Das Fehlen der ROPs oder die Überexpression fördert die Hydrolyse von LDs und reduziert die Anzahl und Größe von LDs. So resultiert die Inaktivierung des ADRP Gens in Mäusen zu einer 60% Reduzierung des hepatischen TAG-Gehalts und zu einer Resistenz gegenüber einer Fettleber im gefasteten Zustand [58]. Beim Knockdown von ADRP in Mäusen wurde die Verschiebung der LD-Größenverteilung in Hepatozyten hin zu kleinen LDs beobachtet, das mit dem Simulationsergebnis gut übereinstimmt. Die relative Häufigkeit der ROPs hat unter dem Einfluss einer hohen Fettsäurebelastung einen starken Einfluss auf LD-Größenverteilung und daher auch auf den TAG-Gehalt der Zelle. Über die Parameter der Bindungskinetiken der PAT-Familie ist sehr wenig bekannt. Im Modell werden daher die Parameter der PAT-Familie in Bezug auf experimentelle Beobachtungen geschätzt.

Darüber hinaus muss die genaue Funktion von bestimmten Proteinen wie DAGT1 und DGAT2 wie auch von den ROPs immer noch geklärt werden. Darum sollte das Modell als vorläufige computergestützte Arbeit betrachtet werden, das zusammen mit neuen experimentellen Ergebnissen erweitert und aktualisiert werden kann. Insbesondere lässt das Modell den räumlichen Aspekt des Lipidmetabolismus außer Acht, der z.B. durch den aktiven Transport von LDs durch die Mikrotubuli, die die gegenseitige Interaktion von LDs einschränkt [146] eine Rolle spielt. Trotz dieser offensichtlichen und erforderlichen Begrenzungen stimmen die Modellvorhersagen mit großen Bereichen der unabhängigen experimentellen Ergebnisse überein (siehe Tabelle 1) und erteilt dem Modell einen hohen Grad an Glaubwürdigkeit. Auf diese Weise kann man es als Werkzeug für die Generierung von Hypothesen nutzen, die für weitere Versuche eingesetzt werden können.

Eine wichtige Schlussfolgerung ist, die durch den Vergleich von Modellsimulation mit den beobachteten LD-Größenverteilungen in TAG-akkumulierenden Zellen erlangt wird, dass die Variation des Expressionslevels von Enzymen und ROPs eine entscheidende Rolle in der kurzzeitigen Adaption von Leberzellen bei einer Fettbelastung spielt. Die Kontrollanalyse verrät, dass die meisten wirkungsvollen Strategien des Hepatozyten bei der Umwandlung von FFSs in TAG darin bestehen die Aufnahme von Fettsäuren zu erhöhen, die Menge an DGAT2 zu

erhöhen, um in schon existierende LDs TAG aufzufüllen und die Menge der ATGL zu reduzieren, um die Lipolyse von wachsenden LDs zu verhindern. Daraus wird ersichtlich, dass zusätzliches TAG für schon existierende LDs bevorzugt wird gegenüber der De-novo-Synthese von vielen kleinen LDs, um den normalen TAG-Gehalt der Zelle zu erhöhen. So ist es naheliegend zu spekulieren, dass die Speicherung von großen LDs ökonomisch vorteilhafter ist, da weniger Phospholipide und ROPs im Vergleich zur Speicherung der gleichen TAG-Menge in kleinen LDs benötigt wird. Die Kontrollanalyse ist aber eine Momentaufnahme für ein Zellexperiment mit festgelegten externen Bedingungen und zeigt auf, dass die Aufnahme von FFSs, der Diacylacyltransferase 2 (DGAT2), das fett-spezifische Protein (FSP27), Adipophilin (ADRP) und der adipozyten Triglyzeridlipase (ATGL) den stärksten Einfluss auf den zellulären TAG-Gehalt haben. In Modellsimulationen des Glukosemetabolismus der Leber wurde gezeigt, dass die Häufigkeit von regulatorischen Schlüsselenzymen abhängig von externen Bedingungen ist [96]. Darüber hinaus war jedes regulatorische Schlüsselprotein für einen einzigen extremen physiologischen Zustand relevant.

Die pro-lipolytische Änderung von regulatorischen Schlüsselproteinen, die durch das Modell vorausgesagt wurde, wird durch Studien untermauert, in denen hepatische Lipidakkumulation mit signifikanten Änderungen in den Mengen von PAT- und CIDE-Proteinen einhergeht, die überwiegend durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und CREBH vermittelt werden [42, 128, 132]. In CREBH-defizienten Mäusen wurde eine durch das Hungern induzierte FSP27 Expression unterdrückt und der TAG-Gehalt der Leber nahm signifikant zu [147].

In Übereinstimmung mit vorherigen Erkenntnissen [135] wurde eine starke Heterogenität des TAG-Gehalts und der LD-Größenverteilung in einzelnen humanen Hepatozyten beobachtet, die alle von der gleichen Leber isoliert und mit FFSs inkubiert wurden. Diese Heterogenität konnte sehr gut in Modellsimulationen reproduziert werden, in denen die Aktivitäten der regulatorischen Schlüsselproteine zufällig gesampelt waren. Die Ergebnisse weisen auf Zell-zu-Zell-Unterschiede in den Genexpressionen (Transkription oder Translation) dieser Proteine hin. Mit moderaten Variationen vom Faktor 1,5 war es ausreichend, dass die breite Streuung der experimentell bestimmten mit den simulierten LD-Größenverteilungen übereinstimmte. Solche Variationen in der Expression der PAT-Proteine wurden auch in Proben von normalen humanen Lebern und Lebern mit unterschiedlichen Grad der Steatose gemessen [42]. Die Ursache der Variabilität der regulatorischen Schlüsselproteine ist noch nicht bekannt. Ehemalige Studien in Einzelzellen und Transkriptomen von Populationen haben markante Unterschiede in globalen Genexpressionsverteilungen offenbart [148], die jedoch weitgehend in Zellensembles reduziert waren [148]. Genetisch berechnetes Rauschen und die Aktivität von bestimmten metabolischen Enzymen (z.B. Glutaminsynthetase) in Hepatozyten zeigt eine zonale Heterogenität d.h. das Expressionslevel hängt von der räumlichen Position der Zellen entlang des Sinusoids ab. Es wird vermutet, dass diese Zonierung die Unterschiede der Plasmakonzentrationen von Metaboliten

(inklusive Sauerstoff) [149] und den Morphogenen wie β -Catenin [150] zwischen den periportal und perivenösen Regionen des Sinusoids widerspiegelt. Zum Beispiel entwickelten β -Catenin transgene Mäuse, die mit hochkalorischer Nahrung gefüttert wurden eine markante perivenöse Steatose. Da die räumliche Herkunft der humanen primären Hepatozyten in den Experimenten unbekannt ist, kann zwischen dem relativen Einfluss dieser möglichen Quellen der Variabilität der Expression nicht unterschieden werden. Die Wiederholung der Experimente mit Zellen, die aus jeder Zone stammen [151], könnte helfen diesen Punkt zu klären.

Unter der Annahme, dass eine ähnliche Variabilität in der Häufigkeit von regulatorischen Schlüsselproteinen auch in intakten Organen gilt, die von Experimenten mit isolierten Zellen geschätzt wurden, wurde das zelluläre TAG-Tagesprofil von Rattenhepatozyten als Antwort auf ein typisches Plasmaprofil der Glukose und der FFSs simuliert. Geringe zufällige Variationen der regulatorischen Schlüsselprozesse vom Faktor 1,5 haben eine Änderung von Faktor 3 im TAG-Gehalt einzelner Zellen hervorgerufen. Unter Hungerbedingungen, die durch konstant erhöhte Plasmakonzentration von FFSs charakterisiert sind, wird in 25 % aller simulierten Zellen ein TAG-Gehalt von über 40 mM erreicht, die hier die Grenzlinie hin zur Steatose überschreiten.

Ob diese erstaunliche Variabilität die heterogene TAG-Verteilung in steatotischen Lebern ausmachen, ist abhängig von der räumlichen Verteilung der heterogenen Genexpression. Wenn ein spezifisches Expressionsprofil für Cluster der Zellen gilt, die einander angrenzen (z.B. in einer speziellen räumlichen Zone des Leberläppchens), würde man eine signifikante Variabilität erwarten, wenn die Zellen zu Clustern mit unterschiedlichen Expressionsprofilen gehören. Daten von Lebersektionen aus der Maus unterstützen die Ansicht aber nicht [135]. Wenn die Heterogenität der Expression von Zelle zu Zelle ohne räumliche Verzerrung auftritt, würde die Zell-zu-Zell-Variabilität im TAG-Gehalt quer durch mesoskopische Größenordnungen durchschnittlich sein. Daher muss noch weiter geklärt werden, wie die einzelnen Risiken für die Entwicklung einer Steatose und die Verteilung von steatotischen Regionen entlang der Leber abhängig von der Expressionsvariabilität der regulatorischen Schlüsselproteine des TAG-Metabolismus und der LD-Dynamik sind. Dazu werden Transkriptomikanalysen [151] und Proteomikanalysen der betreffenden Proteine in Einzelzellenexperimenten benötigt, die von definierten räumlichen Regionen der Leber stammen.

Bezüglich der physiologischen Signifikanz der großen Variabilität in der Lipidspeicherkapazität von einzelnen Zellen weichen die Hypothesen aus der Literatur voneinander ab. Herms et al. [135] behaupten, dass die Existenz von Subpopulationen von Zellen, die effektiv Lipid aufnehmen und speichern womöglich hilfreich für Organe als Ganzes sein kann, da diese Subpopulationen besonders viel Lipid akkumulieren und in mehr LDs speichern und somit mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und das Risiko der Lipotoxizität reduzieren. Diese Reduzierung bezieht sich auf die gesamte Population ohne die Gesamthomeostase zu beeinträchtigen, nachdem die

Zellen mit sehr hohem Lipidgehalt andere Zellen mit einem geringen Lipidgehalt mit gespeicherten Lipiden versorgt haben.

Auf der anderen Seite wird übermäßige Lipidspeicherung durch eine Vergrößerung der Zellgröße begleitet, die den Radius des Sinusoids verkleinert und die hepatische Mikrozirkulation beeinträchtigt (regionale Hypoxie). Es wird vermutet, dass dies ein Teufelskreis hervorruft, indem Sauerstoffmangel die Verwendung von FFSs in der β -Oxidation verringert, dass die Veresterung von FFSs in TAG begünstigt und das starke Vergrößern von Zellen erhöht [152]. Ein weiterer selbstverstärkender Kreislauf, der in heterogen verteilte TAG-Cluster resultiert, wird womöglich durch die erhöhte lokale Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ von steatosen Hepatozyten bestimmt [153]. Da $\text{TNF-}\alpha$ die TAG-Akkumulation in Hepatozyten fördert [154], können womöglich mehrere steatotische Zellen die TAG-Akkumulation in benachbarten Zellen erhöhen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Modellansatz zahlreiche einzelne experimentelle Ergebnisse von Lipiden und des LD-Metabolismus in ein konsistentes mechanistisches Bild bringt. Basierend auf diesem Netzwerkmodell wird eine Prognose zur Variabilität der Häufigkeit von zentralen Enzymen und ROPs gestellt, die für beobachtete interzelluläre Heterogenität von LD-Größenverteilungen berechnet wurde. Es wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem Zellen nach Inkubation mit FFSs zwischen der De-novo-Synthese von LDs hin zum erzwungenen Lipidaufladen von schon vorhandenen LDs wechseln können. Letztlich wird eine Schätzung der Variabilität des zellularen TAG-Gehalts von einer humanen Leber *in vivo* ermöglicht und mögliche Auswirkungen dieser Heterogenität für die Entwicklung der hepatischen Steatose als ein sich selbst verstärkender Prozess diskutiert.

8 Literatur

1. Szczepaniak, L.S., et al., *Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(2): p. E462-8.
2. Feldstein, A.E., et al., *Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 185-94.
3. Pol, A., et al., *Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(1): p. 99-110.
4. Liu, P., et al., *Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(6): p. 784-93.
5. Zehmer, J.K., et al., *A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic*. Proteomics, 2009. **9**(4): p. 914-21.
6. Shelness, G.S. and A.S. Ledford, *Evolution and mechanism of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly*. Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(3): p. 325-32.
7. Shelness, G.S. and J.A. Sellers, *Very-low-density lipoprotein assembly and secretion*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 151-7.
8. Hussain, M.M., et al., *Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s500-6.
9. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.
10. Granneman, J.G., et al., *Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5726-35.
11. Reid, B.N., et al., *Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13087-99.
12. Jump, D.B., et al., *Fatty acid regulation of hepatic gene transcription*. J Nutr, 2005. **135**(11): p. 2503-6.
13. Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx, *The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1302**(2): p. 93-109.
14. Xu, J., et al., *Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23577-83.
15. Dubuquoy, L., et al., *Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases*. Lancet, 2002. **360**(9343): p. 1410-8.
16. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 373-8.
17. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 774-88.
18. Greenberg, A.S., et al., *Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11341-6.
19. Pawella, L.M., et al., *Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis*. J Hepatol, 2014. **60**(3): p. 633-42.
20. Bartz, R., et al., *Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 837-47.
21. Gorrisen, H., A.P. Tulloch, and R.J. Cushley, *Deuterium magnetic resonance of selectively deuterated cholesteryl esters in phosphatidylcholine vesicles*. Biochemistry, 1980. **19**(15): p. 3422-9.
22. Gorrisen, H., A.P. Tulloch, and R.J. Cushley, *Deuterium magnetic resonance of triacylglycerols in phospholipid bilayers*. Chem Phys Lipids, 1982. **31**(3): p. 245-55.
23. Khandelia, H., et al., *Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12811.
24. Duelund, L., et al., *Composition, structure and properties of POPC-triolein mixtures. Evidence of triglyceride domains in phospholipid bilayers*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(8): p. 1909-17.
25. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., *Lipid droplets and cellular lipid metabolism*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 687-714.

26. Zanghellini, J., F. Wodlei, and H.H. von Grunberg, *Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet*. J Theor Biol, 2010. **264**(3): p. 952-61.
27. Sun, Z., et al., *Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1594.
28. Gong, J., et al., *Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites*. J Cell Biol, 2011. **195**(6): p. 953-63.
29. Wilfling, F., et al., *Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets*. Dev Cell, 2013. **24**(4): p. 384-99.
30. Medigeshi, G.R. and P. Schu, *Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46*. Traffic, 2003. **4**(11): p. 802-11.
31. Hartman, I.Z., et al., *Sterol-induced dislocation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from endoplasmic reticulum membranes into the cytosol through a subcellular compartment resembling lipid droplets*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19288-98.
32. Olzmann, J.A., C.M. Richter, and R.R. Kopito, *Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1345-50.
33. Fei, W., et al., *Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 2009. **424**(1): p. 61-7.
34. Krahmer, N., et al., *Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(5): p. 1115-26.
35. Herker, E. and M. Ott, *Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(6): p. 241-8.
36. Wolins, N.E., D.L. Brasaemle, and P.E. Bickel, *A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5484-91.
37. Kimmel, A.R., et al., *Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins*. J Lipid Res, 2010. **51**(3): p. 468-71.
38. Londos, C., et al., *Role of PAT proteins in lipid metabolism*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 45-9.
39. Yang, L., et al., *The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans*. J Lipid Res, 2012. **53**(7): p. 1245-53.
40. Puri, V., et al., *Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7833-8.
41. Caldwell, S.H., et al., *Has natural selection in human populations produced two types of metabolic syndrome (with and without fatty liver)?* J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22 Suppl 1**: p. S11-9.
42. Straub, B.K., et al., *Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1936-46.
43. Arimura, N., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10070-6.
44. Dalen, K.T., et al., *Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1243-52.
45. Brasaemle, D.L., et al., *Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38486-93.
46. Tansey, J.T., et al., *Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8401-6.
47. Takahashi, Y., et al., *Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64605.
48. Martinez-Botas, J., et al., *Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lep^r(db/db) mice*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 474-9.
49. Tansey, J.T., et al., *Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6494-9.
50. Jiang, H.P. and G. Serrero, *Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7856-60.
51. Heid, H.W., et al., *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases*. Cell Tissue Res, 1998. **294**(2): p. 309-21.
52. Brasaemle, D.L., et al., *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2249-63.
53. Steiner, S., et al., *Induction of the adipose differentiation-related protein in liver of etomoxir-treated rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(3): p. 777-82.

54. Targett-Adams, P., et al., *A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1728**(1-2): p. 95-104.
55. Edvardsson, U., et al., *PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 329-40.
56. Imamura, M., et al., *ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(4): p. E775-83.
57. Listenberger, L.L., et al., *Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2751-61.
58. Chang, B.H., et al., *Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(3): p. 1063-76.
59. Sztalryd, C., et al., *Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34341-8.
60. Bell, M., et al., *Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 2037-45.
61. Miura, S., et al., *Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32253-7.
62. Diaz, E. and S.R. Pfeffer, *TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking*. Cell, 1998. **93**(3): p. 433-43.
63. Ohsaki, Y., et al., *Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(1): p. 279-87.
64. Bulankina, A.V., et al., *TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 641-55.
65. Li, J.Z. and P. Li, *Cide proteins and the development of obesity*. Novartis Found Symp, 2007. **286**: p. 155-9; discussion 159-63, 196-203.
66. Matsusue, K., et al., *Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27*. Cell Metab, 2008. **7**(4): p. 302-11.
67. Nishino, N., et al., *FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2808-21.
68. Flach, R.J., et al., *Loss of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 protects from hepatic steatosis by repression of cell death-inducing DNA fragmentation factor A (DFFA)-like effector C (CIDEA)/fat-specific protein 27*. J Biol Chem, 2011. **286**(25): p. 22195-202.
69. Aibara, D., et al., *Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver*. Biol Pharm Bull, 2013. **36**(11): p. 1766-72.
70. Toh, S.Y., et al., *Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2890.
71. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study*. Hepatology, 2005. **42**(1): p. 44-52.
72. Adams, L.A., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Nonalcoholic fatty liver disease*. CMAJ, 2005. **172**(7): p. 899-905.
73. Rao, M.S. and J.K. Reddy, *PPARalpha in the pathogenesis of fatty liver disease*. Hepatology, 2004. **40**(4): p. 783-6.
74. Zafrani, E.S., *Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum*. Virchows Arch, 2004. **444**(1): p. 3-12.
75. Guzman, M. and J. Castro, *Alterations in the regulatory properties of hepatic fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I activity after ethanol feeding and withdrawal*. Alcohol Clin Exp Res, 1990. **14**(3): p. 472-7.
76. Younossi, Z.M., et al., *Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(6): p. 524-530 e1; quiz e60.
77. Alberti, K.G., et al., *The metabolic syndrome—a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
78. Nassir, F., et al., *Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2015. **11**(3): p. 167-75.
79. Wang, C.W., Y.H. Miao, and Y.S. Chang, *Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 6): p. 1214-28.

80. Hamilton, J.A., W. Guo, and F. Kamp, *Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins?* Mol Cell Biochem, 2002. **239**(1-2): p. 17-23.
81. Pownall, H.J. and J.A. Hamilton, *Energy translocation across cell membranes and membrane models.* Acta Physiol Scand, 2003. **178**(4): p. 357-65.
82. Doege, H. and A. Stahl, *Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models.* Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 259-68.
83. Richieri, G.V. and A.M. Kleinfeld, *Unbound free fatty acid levels in human serum.* J Lipid Res, 1995. **36**(2): p. 229-40.
84. Lewin, T.M., et al., *Mice deficient in mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 have diminished myocardial triacylglycerol accumulation during lipogenic diet and altered phospholipid fatty acid composition.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(6-7): p. 352-8.
85. Dircks, L.K. and H.S. Sul, *Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase.* Biochim Biophys Acta, 1997. **1348**(1-2): p. 17-26.
86. Weiss, S.B., E.P. Kennedy, and J.Y. Kiyasu, *The enzymatic synthesis of triglycerides.* J Biol Chem, 1960. **235**: p. 40-4.
87. Wurie, H.R., L. Buckett, and V.A. Zammit, *Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells.* FEBS J, 2012. **279**(17): p. 3033-47.
88. Li, J., D.J. Matye, and T. Li, *Insulin resistance induces posttranslational hepatic sortilin 1 degradation in mice.* J Biol Chem, 2015. **290**(18): p. 11526-36.
89. Allister, E.M., et al., *Insulin decreases the secretion of apoB-100 from hepatic HepG2 cells but does not decrease the secretion of apoB-48 from intestinal CaCo-2 cells.* J Biomed Sci, 2004. **11**(6): p. 789-98.
90. Jungst, C., M. Klein, and A. Zumbusch, *Long-term live cell microscopy studies of lipid droplet fusion dynamics in adipocytes.* J Lipid Res, 2013. **54**(12): p. 3419-29.
91. Lass, A., et al., *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome.* Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 309-19.
92. Yeaman, S.J., *Hormone-sensitive lipase--a multipurpose enzyme in lipid metabolism.* Biochim Biophys Acta, 1990. **1052**(1): p. 128-32.
93. Kraemer, F.B. and W.J. Shen, *Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis.* J Lipid Res, 2002. **43**(10): p. 1585-94.
94. Holm, C., *Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis.* Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1120-4.
95. Sparks, J.D. and C.E. Sparks, *Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes.* J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8854-62.
96. Bulik, S., H.G. Holzhutter, and N. Berndt, *The relative importance of kinetic mechanisms and variable enzyme abundances for the regulation of hepatic glucose metabolism--insights from mathematical modeling.* BMC Biol, 2016. **14**: p. 15.
97. Chambaz, J., et al., *Essential fatty acid uptake and esterification in primary culture of rat hepatocytes.* Biochim Biophys Acta, 1986. **878**(3): p. 310-9.
98. Weisiger, R., J. Gollan, and R. Ockner, *Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances.* Science, 1981. **211**(4486): p. 1048-51.
99. Goh, E.H. and M. Heimberg, *Effects of free fatty acids on activity of hepatic microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and on secretion of triglyceride and cholesterol by liver.* J Biol Chem, 1977. **252**(9): p. 2822-6.
100. Durrington, P.N., et al., *Effects of insulin and glucose on very low density lipoprotein triglyceride secretion by cultured rat hepatocytes.* J Clin Invest, 1982. **70**(1): p. 63-73.
101. Soler-Argilaga, C. and M. Heimberg, *Comparison of metabolism of free fatty acid by isolated perfused livers from male and female rats.* J Lipid Res, 1976. **17**(6): p. 605-15.
102. Yamazaki, T., et al., *Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1.* J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21506-14.
103. Millar, J.S., et al., *Short-term overexpression of DGAT1 or DGAT2 increases hepatic triglyceride but not VLDL triglyceride or apoB production.* J Lipid Res, 2006. **47**(10): p. 2297-305.
104. Bagnato, C. and R.A. Igal, *Overexpression of diacylglycerol acyltransferase-1 reduces phospholipid synthesis, proliferation, and invasiveness in simian virus 40-transformed human lung fibroblasts.* J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52203-11.

105. Stone, S.J., et al., *Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11767-76.
106. Liu, Y., et al., *Knockdown of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotide reduces VLDL TG and ApoB secretion in mice*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(3): p. 97-104.
107. Li, C., et al., *Roles of Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferases 1 and 2 in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Primary Hepatocytes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(5): p. 1080-91.
108. Choi, C.S., et al., *Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22678-88.
109. Tietge, U.J., et al., *Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B*. J Lipid Res, 1999. **40**(11): p. 2134-9.
110. Hebbachi, A. and G.F. Gibbons, *Inactivation of microsomal triglyceride transfer protein impairs the normal redistribution but not the turnover of newly synthesized glycerolipid in the cytosol, endoplasmic reticulum and Golgi of primary rat hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1441**(1): p. 36-50.
111. Minehira, K., et al., *Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 2038-44.
112. Raabe, M., et al., *Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1287-98.
113. Ong, K.T., et al., *Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 116-26.
114. Smirnova, E., et al., *ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells*. EMBO Rep, 2006. **7**(1): p. 106-13.
115. Reid, B.N., et al., *Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(19): p. 13087-13099.
116. Wu, J.W., et al., *Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 122-32.
117. Guo, F., et al., *Deficiency of liver Comparative Gene Identification-58 causes steatohepatitis and fibrosis in mice*. J Lipid Res, 2013. **54**(8): p. 2109-20.
118. Zhou, L., et al., *Insulin resistance and white adipose tissue inflammation are uncoupled in energetically challenged Fsp27-deficient mice*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 5949.
119. Najt, C.P., et al., *Liver-specific Loss of Perilipin 2 Alleviates Diet-Induced Hepatic Steatosis, Inflammation, and Fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016: p. aipgi 00436 2015.
120. Chang, B.H., et al., *Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6051-5.
121. Liang, J.J., et al., *Overexpression of human diacylglycerol acyltransferase 1, acyl-coa:cholesterol acyltransferase 1, or acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins in McA-RH7777 cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44938-44.
122. Najt, C.P., et al., *Liver-specific loss of Perilipin 2 alleviates diet-induced hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016. **310**(9): p. G726-38.
123. Xu, W., et al., *Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor-alpha-like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes*. J Biol Chem, 2016. **291**(9): p. 4282-93.
124. Fredrikson, G., et al., *Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties*. J Biol Chem, 1981. **256**(12): p. 6311-20.
125. Mitsuyoshi, H., et al., *Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatol Res, 2009. **39**(4): p. 366-73.
126. Sheedfar, F., et al., *Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Aging (Albany NY), 2014. **6**(4): p. 281-95.
127. Kato, M., N. Higuchi, and M. Enjoji, *Reduced hepatic expression of adipose tissue triglyceride lipase and CGI-58 may contribute to the development of non-alcoholic fatty liver disease in patients with insulin resistance*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(8): p. 1018-9.
128. Xu, X., et al., *Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis*. Hepatology, 2015. **61**(3): p. 857-69.

129. Cantley, J.L., et al., *CGI-58 knockdown sequesters diacylglycerols in lipid droplets/ER-preventing diacylglycerol-mediated hepatic insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(5): p. 1869-74.
130. Brown, J.M., et al., *CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance*. J Lipid Res, 2010. **51**(11): p. 3306-15.
131. Motomura, W., et al., *Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1111-8.
132. Okumura, T., *Role of lipid droplet proteins in liver steatosis*. J Physiol Biochem, 2011. **67**(4): p. 629-36.
133. Robenek, H., et al., *Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 408-18.
134. Borradaile, N.M., et al., *Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death*. J Lipid Res, 2006. **47**(12): p. 2726-37.
135. Herms, A., et al., *Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity*. Curr Biol, 2013. **23**(15): p. 1489-96.
136. Novikoff, A.B., *Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat: staining reactions*. J Histochem Cytochem, 1959. **7**(4): p. 240-4.
137. Loud, A.V., *A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells*. J Cell Biol, 1968. **37**(1): p. 27-46.
138. Gebhardt, R. and M. Matz-Soja, *Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(26): p. 8491-504.
139. Braeuning, A., et al., *Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes*. FEBS J, 2006. **273**(22): p. 5051-61.
140. Massimi, M., et al., *Differential expression of apolipoprotein E messenger RNA within the rat liver lobule determined by in situ hybridization*. Hepatology, 1999. **29**(5): p. 1549-55.
141. Kleiner, D.E., *The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(1): p. 52-64.
142. Loo, L.H., et al., *Heterogeneity in the physiological states and pharmacological responses of differentiating 3T3-L1 preadipocytes*. J Cell Biol, 2009. **187**(3): p. 375-84.
143. Yu, X.X., et al., *Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice*. Hepatology, 2005. **42**(2): p. 362-71.
144. Greenberg, A.S., et al., *The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2102-10.
145. Gocze, P.M. and D.A. Freeman, *Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells*. Cytometry, 1994. **17**(2): p. 151-8.
146. Welte, M.A., et al., *Developmental regulation of vesicle transport in Drosophila embryos: forces and kinetics*. Cell, 1998. **92**(4): p. 547-57.
147. Lee, J.H., et al., *The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism*. Nat Med, 2011. **17**(7): p. 812-5.
148. Elowitz, M.B., et al., *Stochastic gene expression in a single cell*. Science, 2002. **297**(5584): p. 1183-6.
149. Piras, V. and K. Selvarajoo, *The reduction of gene expression variability from single cells to populations follows simple statistical laws*. Genomics, 2015. **105**(3): p. 137-44.
150. Jungermann, K. and T. Kietzmann, *Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver*. Hepatology, 2000. **31**(2): p. 255-60.
151. Lindros, K.O. and K.E. Penttila, *Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes*. Biochem J, 1985. **228**(3): p. 757-60.
152. Bahar Halpern, K. and S. Itzkovitz, *Single molecule approaches for quantifying transcription and degradation rates in intact mammalian tissues*. Methods, 2016. **98**: p. 134-42.
153. Schleicher, J., et al., *A theoretical study of lipid accumulation in the liver-implications for nonalcoholic fatty liver disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(1): p. 62-9.
154. Pan, X., et al., *Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients*. Endocrine, 2015. **48**(3): p. 834-47.
155. Spector, A.A., *Fatty-Acid Binding to Plasma Albumin*. Journal of Lipid Research, 1975. **16**(3): p. 165-179.
156. Kampf, J.P. and A.M. Kleinfeld, *Fatty acid transport in adipocytes monitored by imaging intracellular free fatty acid levels*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(34): p. 35775-35780.
157. Stremmel, W., G. Strohmeyer, and P.D. Berk, *Hepatocellular Uptake of Oleate Is Energy-Dependent, Sodium Linked, and Inhibited by an Antibody to a Hepatocyte Plasma-Membrane Fatty-Acid Binding-Protein*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(11): p. 3584-3588.
158. Kim, J.H., T.M. Lewin, and R.A. Coleman, *Expression and characterization of recombinant rat Acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24667-73.
159. McGarry, J.D. and N.F. Brown, *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis*. Eur J Biochem, 1997. **244**(1): p. 1-14.
160. McGarry, J.D., et al., *Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat*. Biochem J, 1983. **214**(1): p. 21-8.
161. Saggerson, E.D. and C.A. Carpenter, *Effects of fasting and malonyl CoA on the kinetics of carnitine palmitoyltransferase and carnitine octanoyltransferase in intact rat liver mitochondria*. FEBS Lett, 1981. **132**(2): p. 166-8.
162. Saggerson, E.D., C.A. Carpenter, and B.S. Tselentis, *Effects of thyroidectomy and starvation on the activity and properties of hepatic carnitine palmitoyltransferase*. Biochem J, 1982. **208**(3): p. 667-72.
163. Yada, R., H. Ide, and Y. Nakazawa, *In vitro effects of chlorpromazine on glycerol-3-phosphate acyl transferase and 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase in rat liver microsomes*. Biochem Pharmacol, 1986. **35**(22): p. 4083-7.
164. Yamashita, S. and S. Numa, *Partial purification and properties of glycerophosphate acyltransferase from rat liver. Formation of 1-acylglycerol 3-phosphate from sn-glycerol 3-phosphate and palmityl coenzyme A*. Eur J Biochem, 1972. **31**(3): p. 565-73.
165. Yamashita, A., et al., *Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(9): p. 1202-15.
166. Han, G.S. and G.M. Carman, *Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14628-38.
167. Coleman, R. and R.M. Bell, *Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols*. J Biol Chem, 1976. **251**(15): p. 4537-43.
168. Hosaka, K., U. Schiele, and S. Numa, *Diacylglycerol acyltransferase from rat liver microsomes. Separation and acyl-donor specificity*. Eur J Biochem, 1977. **76**(1): p. 113-8.

9 Anhang

9.1 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt und angewandte Methoden vorgestellt.

9.1.1 Material

9.1.1.1 Geräte und Chemikalien

Es wurden Chemikalien der folgenden Firmen eingesetzt: Gibco (USA).

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	HERA Cell 150 (Thermo Scientific/ Heraeus, Hanau)
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra Biosciences, Biebertal)
Fluoreszenzmikroskope	Konfokales Laserscanningmikroskop Nikon Ti-E (Nikon Instruments, Düsseldorf)
Lichtmikroskope	BX51 (Olympus, Tokio)
Wasserbad	WPE45 (Mettler, Schwabach)
Zellkulturbank	HeraSafe (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen	5804 (Eppendorf, Hamburg)
Zellzählgerät	Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, Darmstadt)
Zellzählkammer	Neubauer (Brand, Wertheim)

9.1.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

10x PBS	1,3 M NaCl
	90 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
	25 mM NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O
Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 g /L Trypsin und 0,2 g/L EDTA
Fetales Kälberserum (FBS)	Zusatzstoff für Zellkulturmedium
„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM)	10% FBS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin

9.1.1.3 Zelllinien

Die humanen Hepatomzelllinien wurden über „American Type Culture Collection“ (ATCC, Wesel) und „Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank“ (JCRB0403, Japan) erworben. Die PLC (Hepatozelluläres Karzinom) Zelllinie wurde im Kultivierungsmedium DMEM kultiviert.

9.1.2 Methoden

9.1.2.1 Immunfluoreszenzphasenkontrastmikroskopie „live cell imaging“

Die verwendeten humanen Hepatomzellen PLC wurden für die jeweilige Experimentierdauer mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch in 6-Well-Kulturplatten inkubiert. Mit dem Phasenkontrastmikroskop von Nikon TiE wurden Bilder mit 40x Vergrößerung und zeitabhängigen axialen Bildstapeln aufgenommen. Für das Anfärben der Lipidtropfen wurde MDH verwendet.

9.1.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie „live cell imaging“

Die verwendeten humanen Hepatomzellen wurden für die jeweilige Experimentierdauer mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch in 6-Well-Kulturplatten inkubiert. Danach wurden die Zellen für Aufnahmen in die Inkubationskammer des Immunfluoreszenzmikroskops gestellt, welche eine 50% Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 37°C gewährleistete. Die Bilder wurden mit 40x Vergrößerung und zeitabhängigen axialen Bildstapeln aufgenommen. Lipidtropfen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff Monodansylpentane (MDH) für 15 Minuten angefärbt, indem die Zellen zunächst mit PBS einmal gewaschen und anschließend mit 0,1 mM MDH für 15 Minuten inkubiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Medium dreifach gewaschen und mit phenolfreiem Medium versetzt.

9.1.2.3 Quantifizierung von Lipidtropfenverteilungen

Die Verteilungen wurden mit Hilfe der NIS-Elements-Software von Nikon analysiert. Dazu wurde auf jeder Aufnahme der jeweilige Tropfen gekennzeichnet und der errechnete Radius bzw. Durchmesser notiert (siehe Abbildung 29). Zusätzlich wurden die Fläche und der Radius des Zellkerns erfasst.

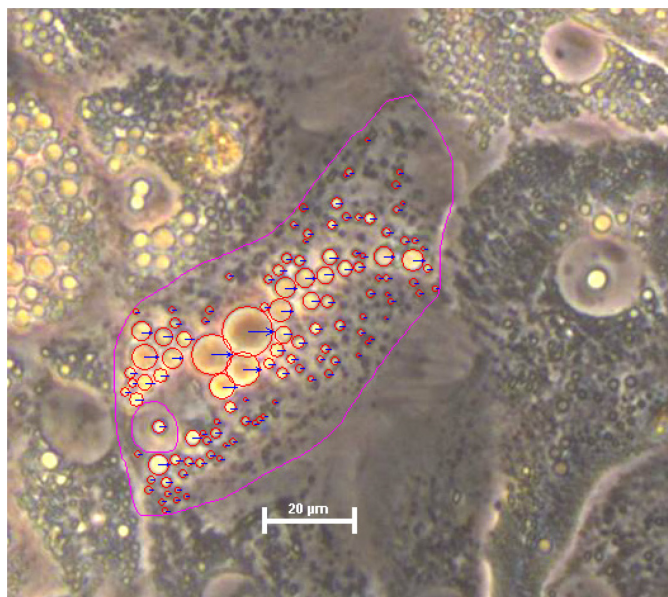


Abbildung 29: Beispiel für die Quantifizierung des Durchmessers von Lipidtropfen und des Zellkerns sowie der Fläche der Zelle mit der NIS-Elements-Software.

9.1.2.4 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle verwendeten hepato-Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt und 100% Feuchtigkeit im entsprechenden Medium kultiviert. Die adhärenenten Zelllinien wurden beim Erreichen von einer 80-90%-igen Konfluenz in der Zellkulturflasche passagiert. Zunächst wurden die Zellen nach dem Entfernen des Zellkulturmediums mit EDTA-Lösung gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Die Enzymreaktion wurde danach mit 2 ml Medium gestoppt. Nach der Zentrifugation von 2-3 Minuten in einem Zentrifugenröhrchen wurde das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert und anschließend die Zellen in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank kultiviert.

9.1.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden Zellen mit 90%-iger Konfluenz als Zellpellet mit 80% FCS und 20% DMSO versetzt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung tiefgefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad mit 37°C erwärmt und mit 10 ml Medium suspendiert, um diese anschließend für 5 Minuten bei 400x g zu zentrifugieren. Zum Resuspendieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit frischen Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen in einer Zellkulturflasche ausgesät.

9.1.2.6 Zellzahlbestimmung

Um eine bestimmte Anzahl von Zellen auszusähen, wurde die Zellzahl mit Hilfe des Scepter™ 2.0 Cell Counter bestimmt. Mit 50 µl der Zellsuspension konnte der Sensor des Scepter™ 2.0 Cell Counter die Zellzahl automatisch bestimmen.

9.2 Auswertung experimenteller Daten

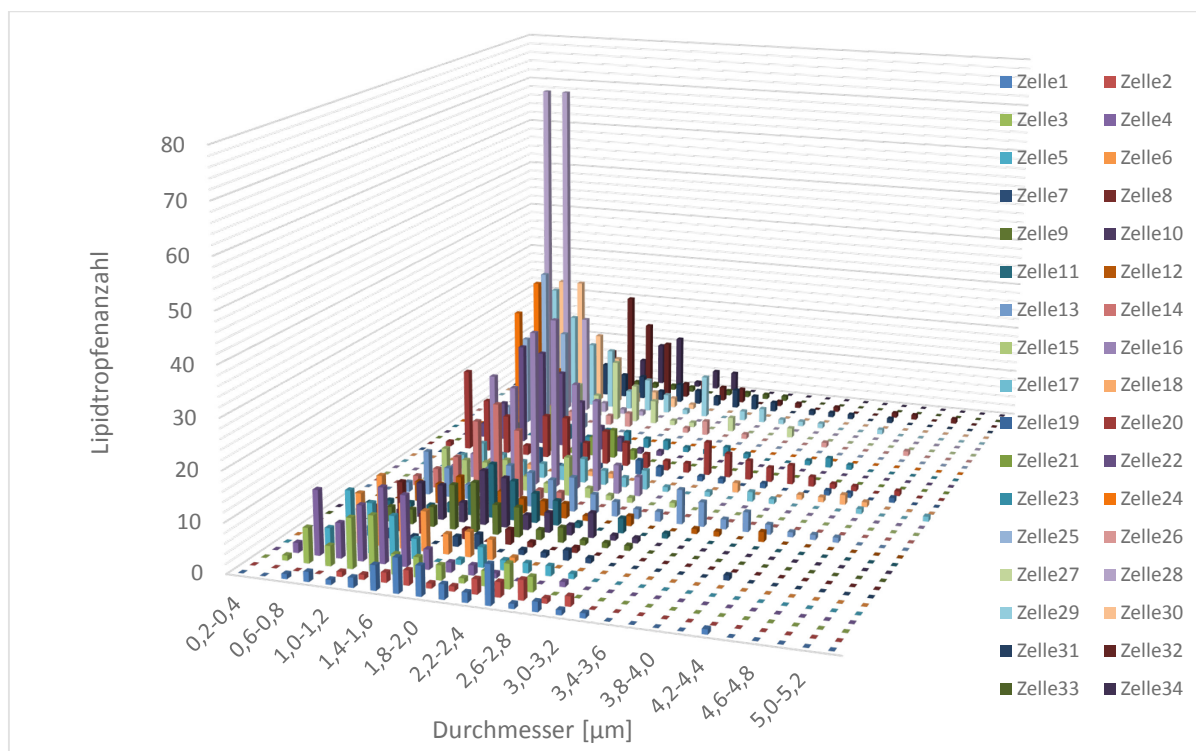


Abbildung 30: Quantifizierung der Lipidtropfenverteilungen in PLC-Zellen nach 24 h Verfettung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1).

Patienten mit hohem Anfangslipidgehalt:

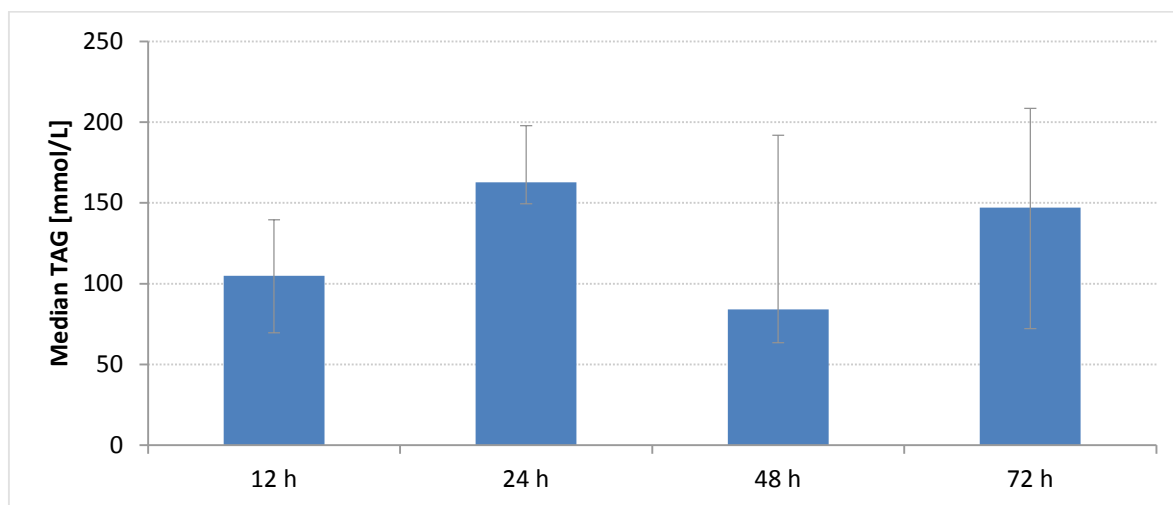


Abbildung 31: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten (Patient 1) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation und der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

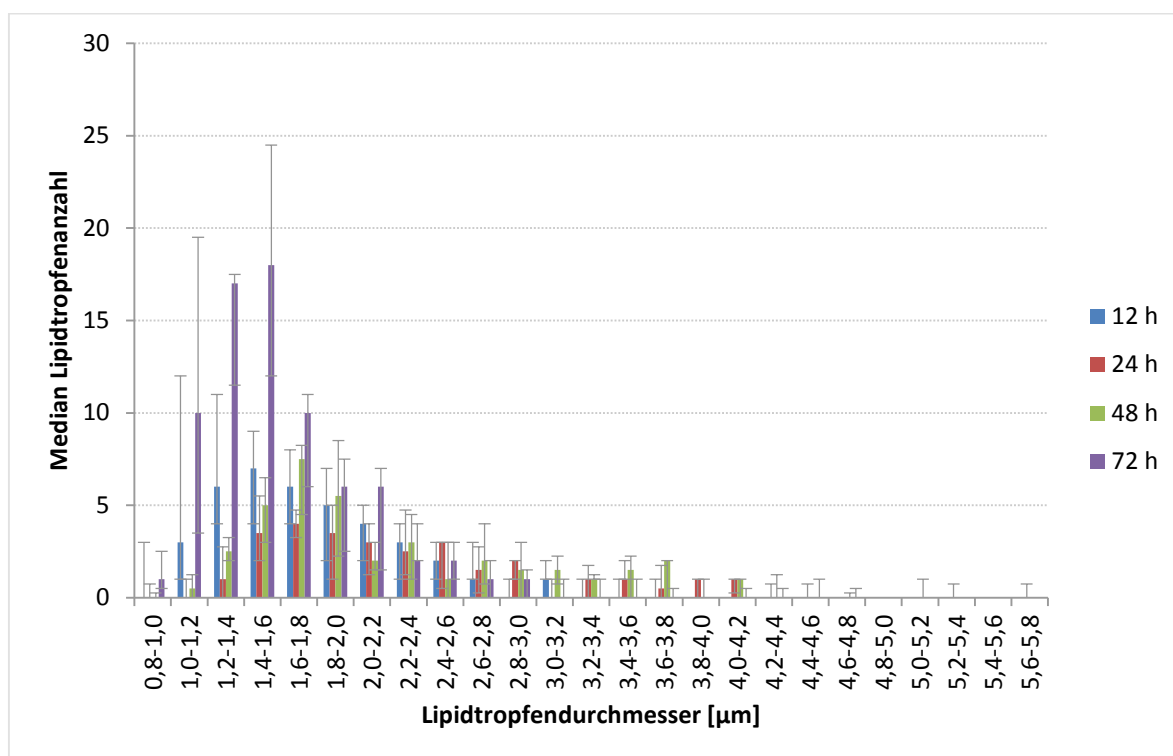


Abbildung 32: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten (Patient 1) nach 12 h (blaue Balken) Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24 (rot), 48 (grün) und 72 Stunden (lila).

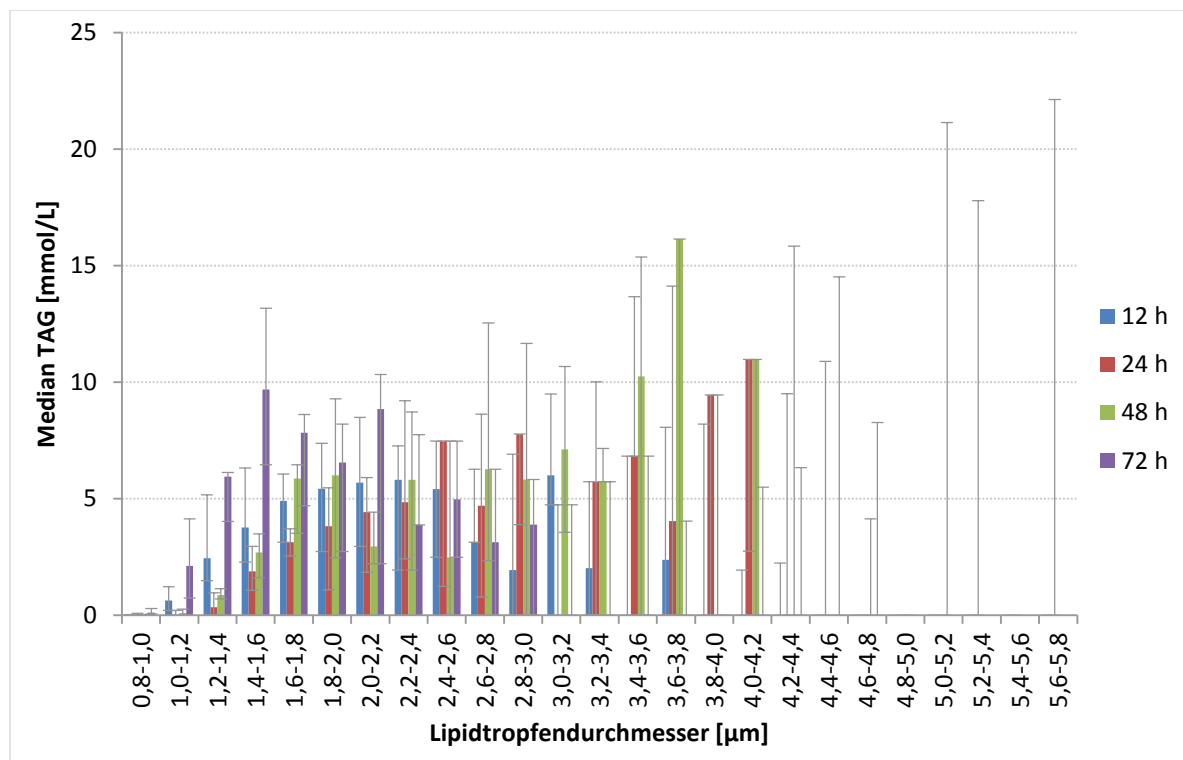


Abbildung 33: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten (Patient 1) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

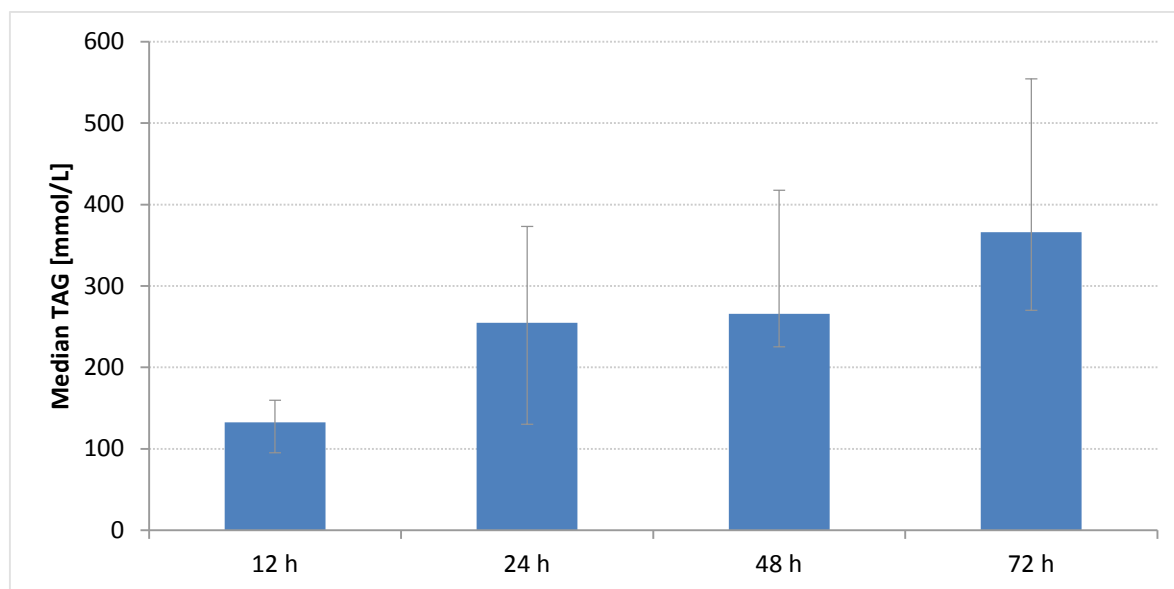


Abbildung 34: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten (Patient 5) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation und der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

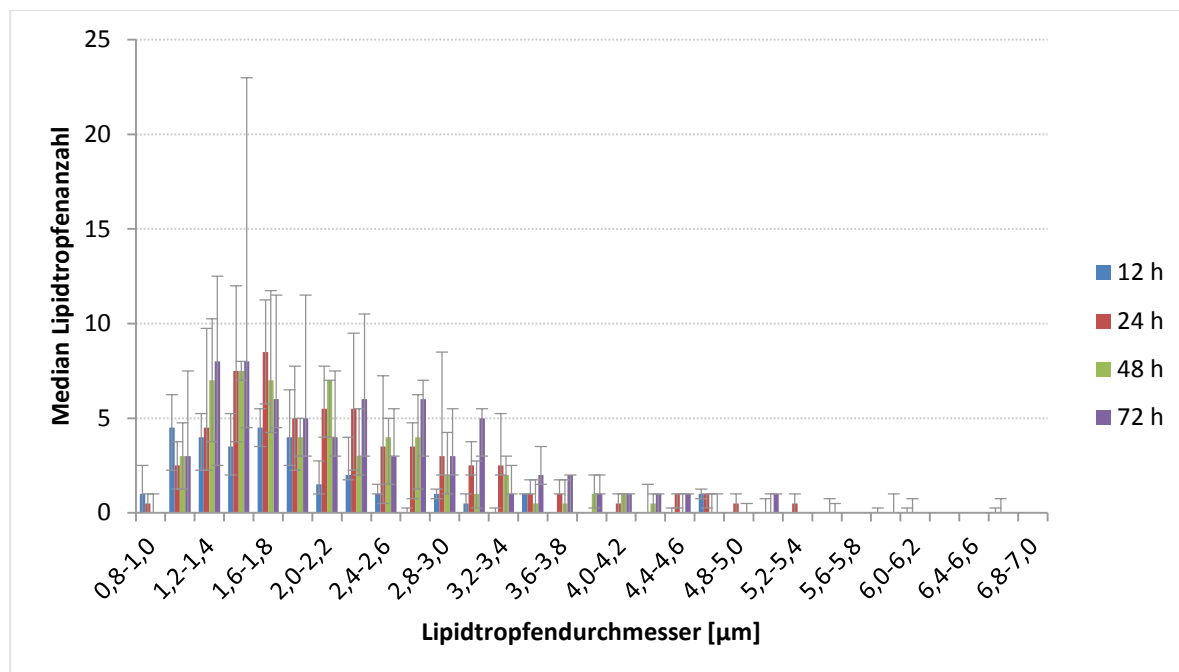


Abbildung 35: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten (Patient 5) nach 12 h (blaue Balken) Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24 (rot), 48 (grün) und 72 Stunden (lila).

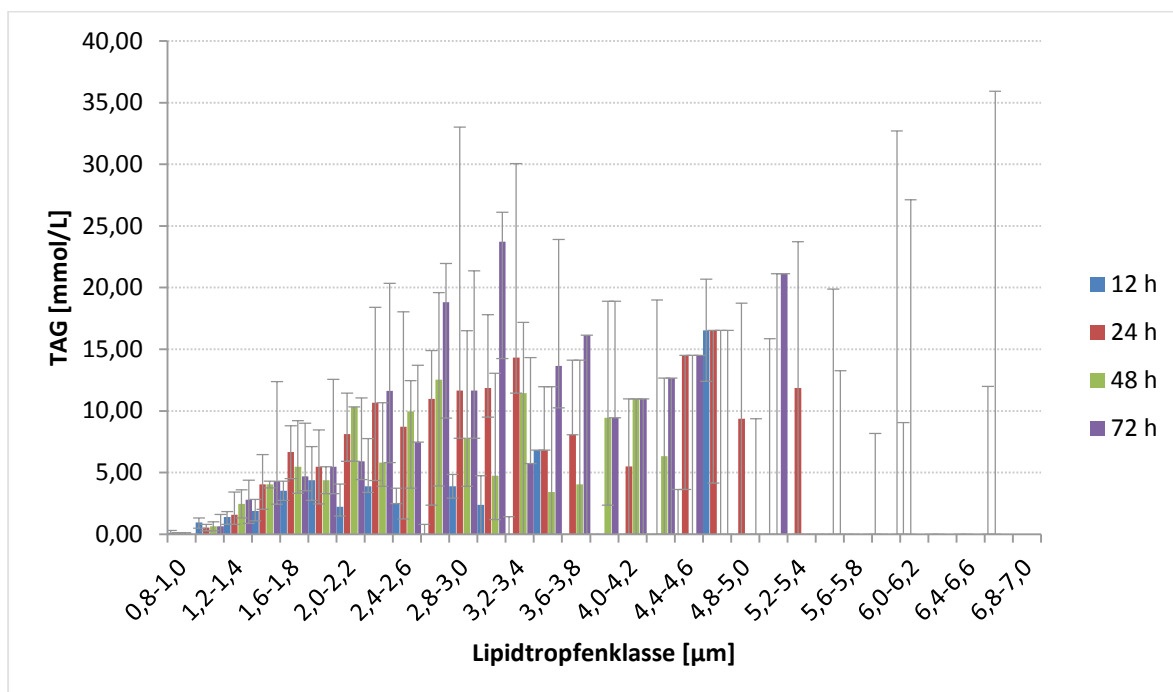


Abbildung 36: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten (Patient 5) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

Patienten mit niedrigem Anfangslipidgehalt:

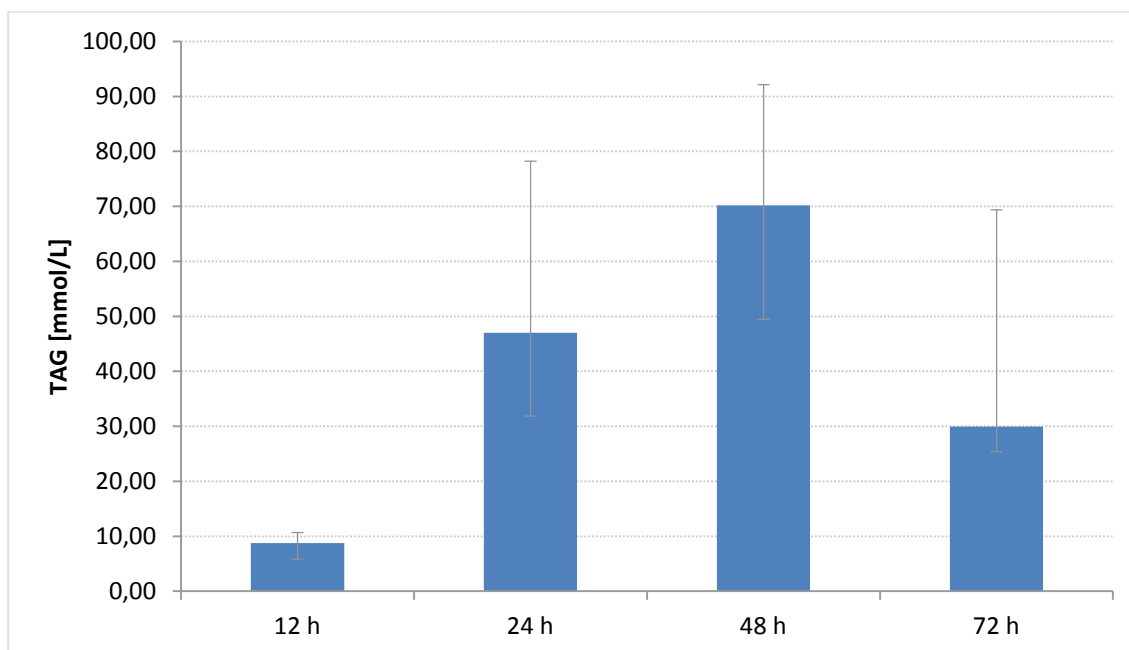


Abbildung 37: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten (Patient 2) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation und der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

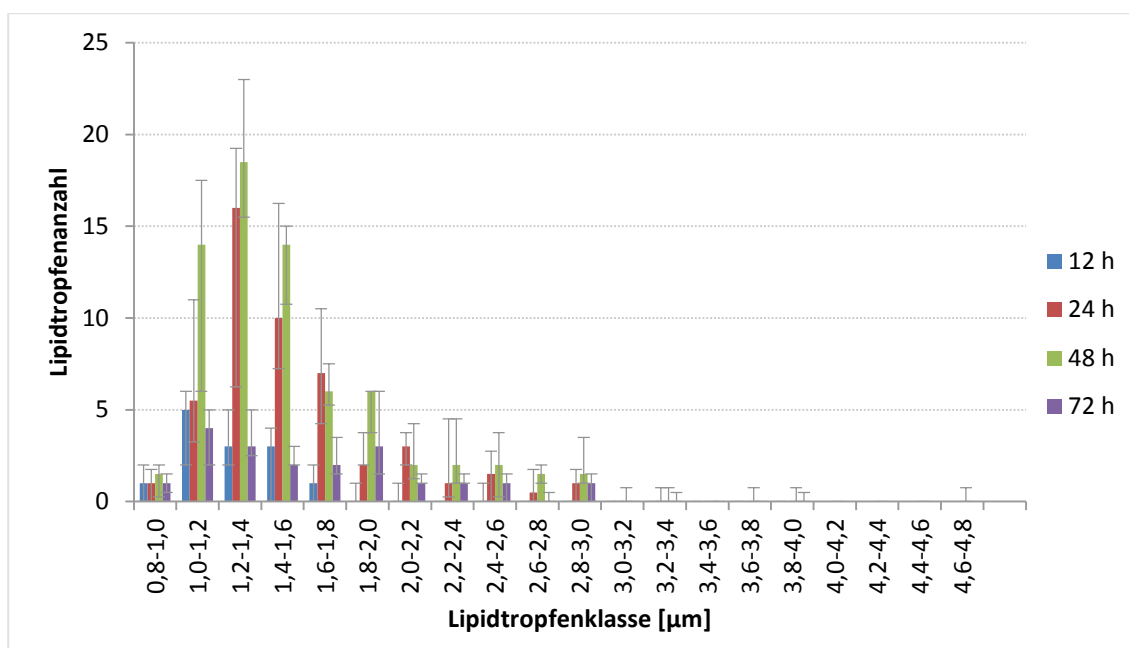


Abbildung 38: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten (Patient 2) nach 12 h (blaue Balken) Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24 (rot), 48 (grün) und 72 Stunden (lila).

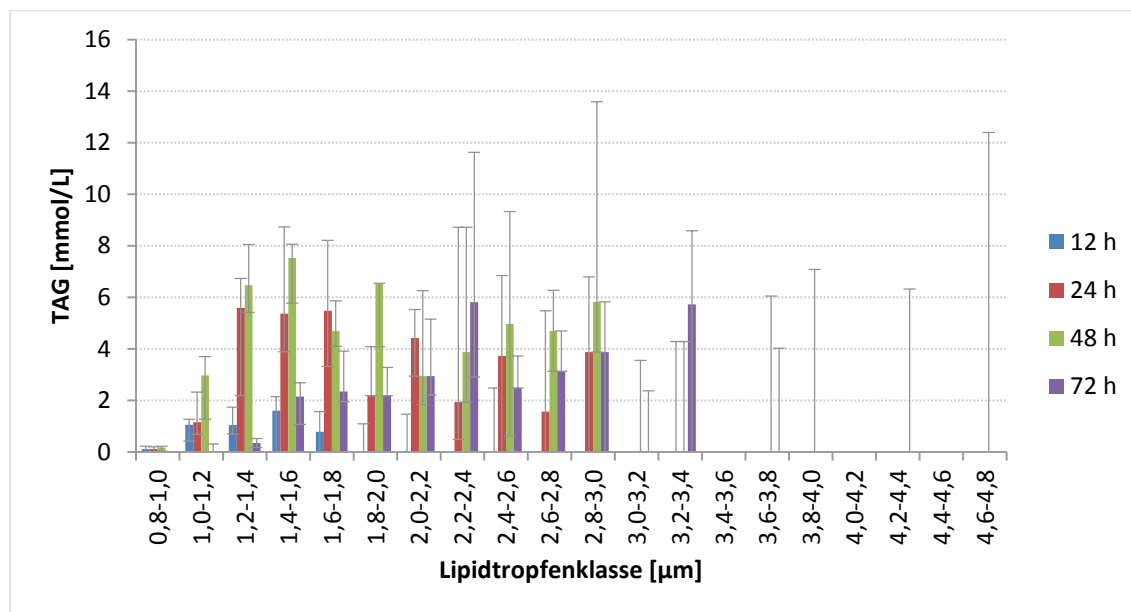


Abbildung 39: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten (Patient 5) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

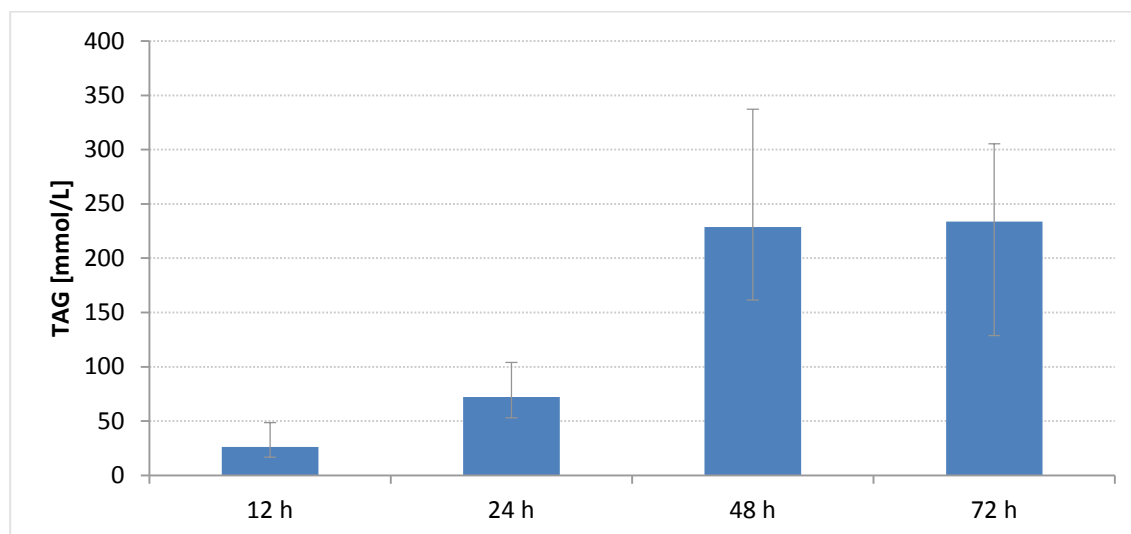


Abbildung 40: Quantifizierung der zeitabhängigen Zunahme des intrazellulären TAG-Gehalts von humanen Hepatozyten (Patient 3) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation und der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

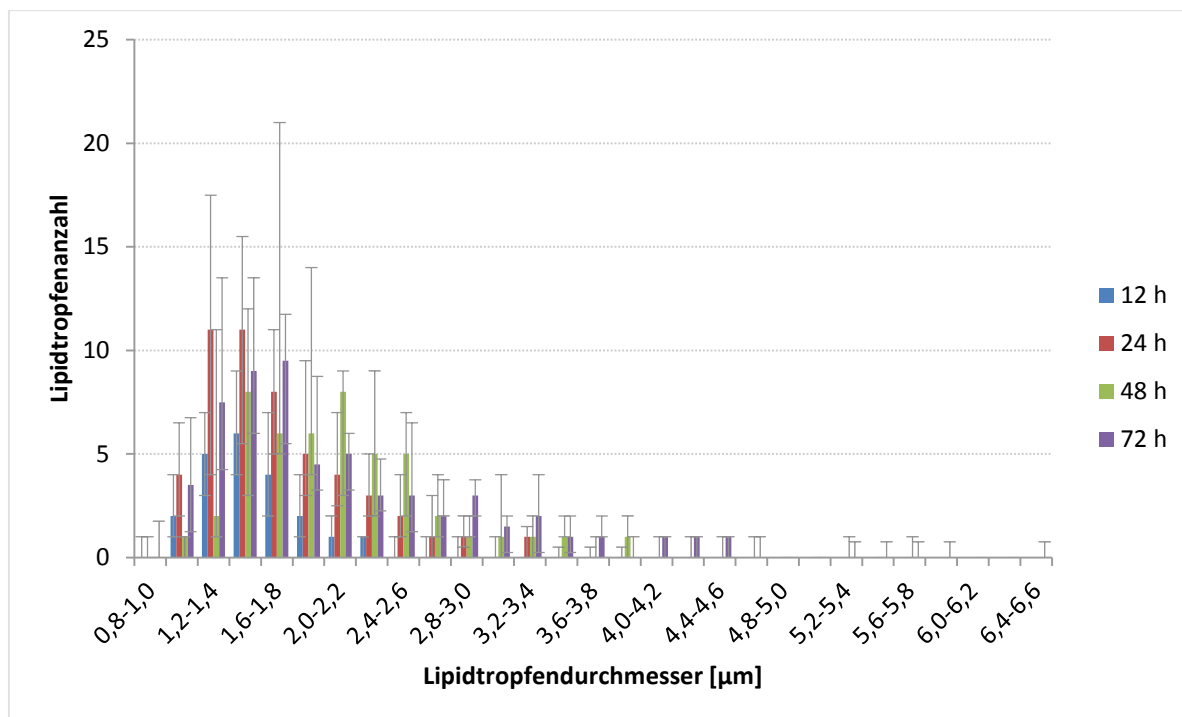


Abbildung 41: Quantifizierung der intrazellulären Lipidtropfenverteilung von humanen Hepatozyten (Patient 3) nach 12 h (blaue Balken) Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24 (rot), 48 (grün) und 72 Stunden (lila).

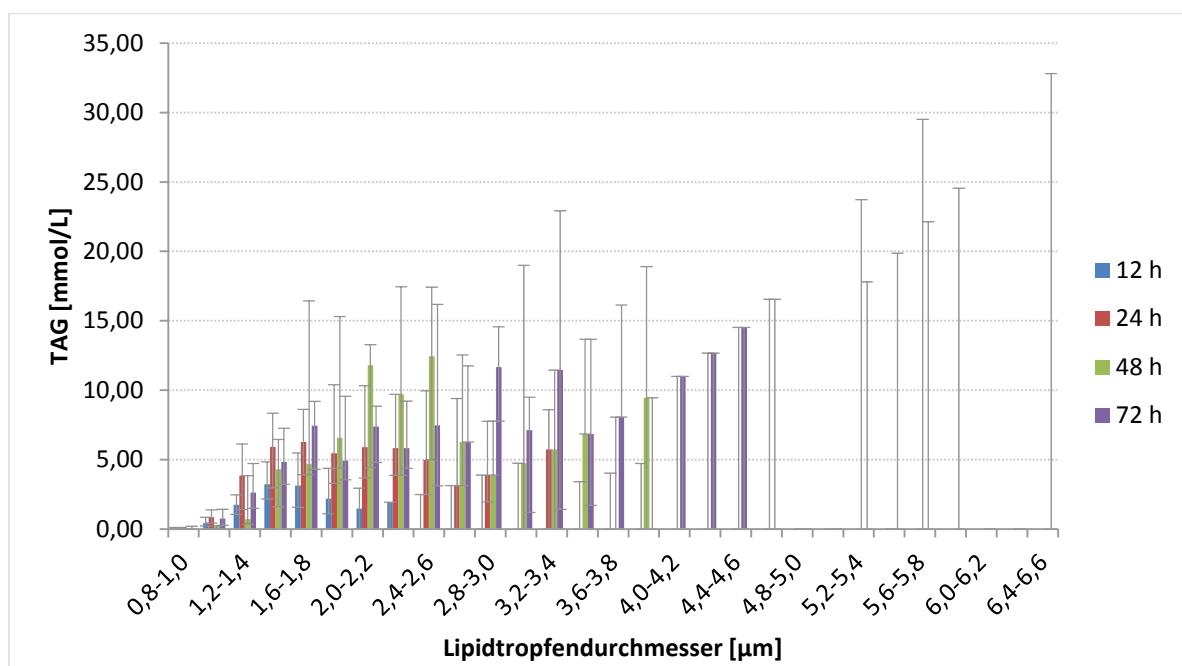


Abbildung 42: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten (Patient 3) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden.

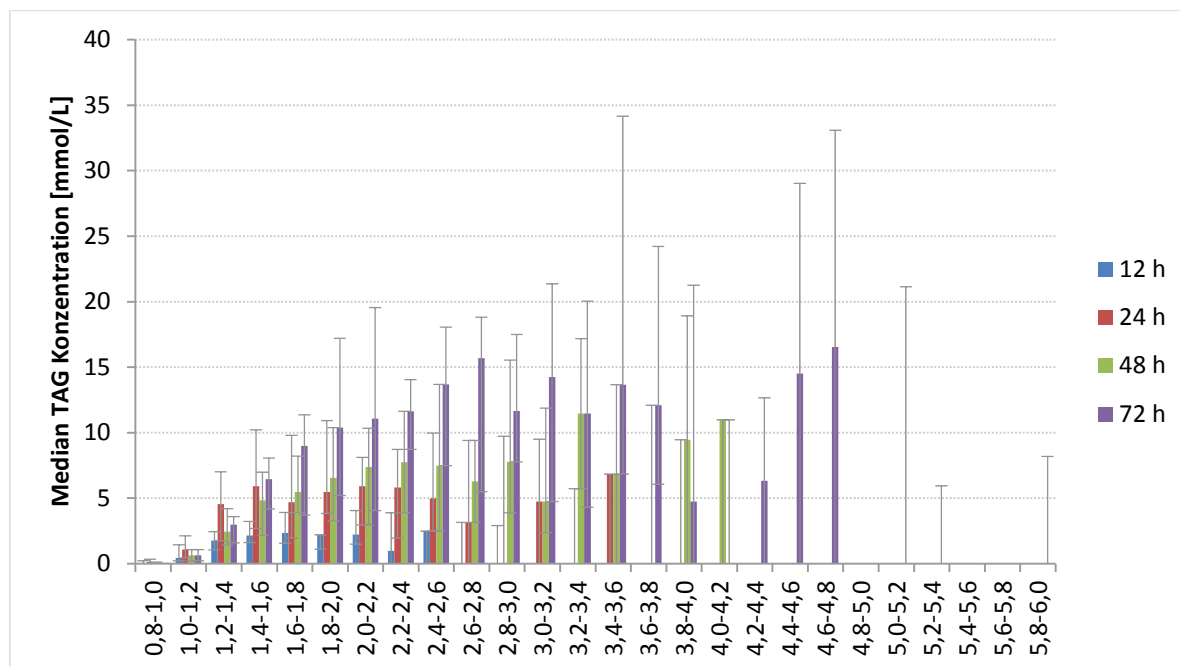


Abbildung 43: Quantifizierung der intrazellulären TAG-Verteilung von humanen Hepatozyten (Patient 4) nach 12 h Kultivierung im William's-E-Kulturmedium nach der Isolation aus tumorfreiem Gewebe und nach der Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1) nach 24, 48 und 72 Stunden

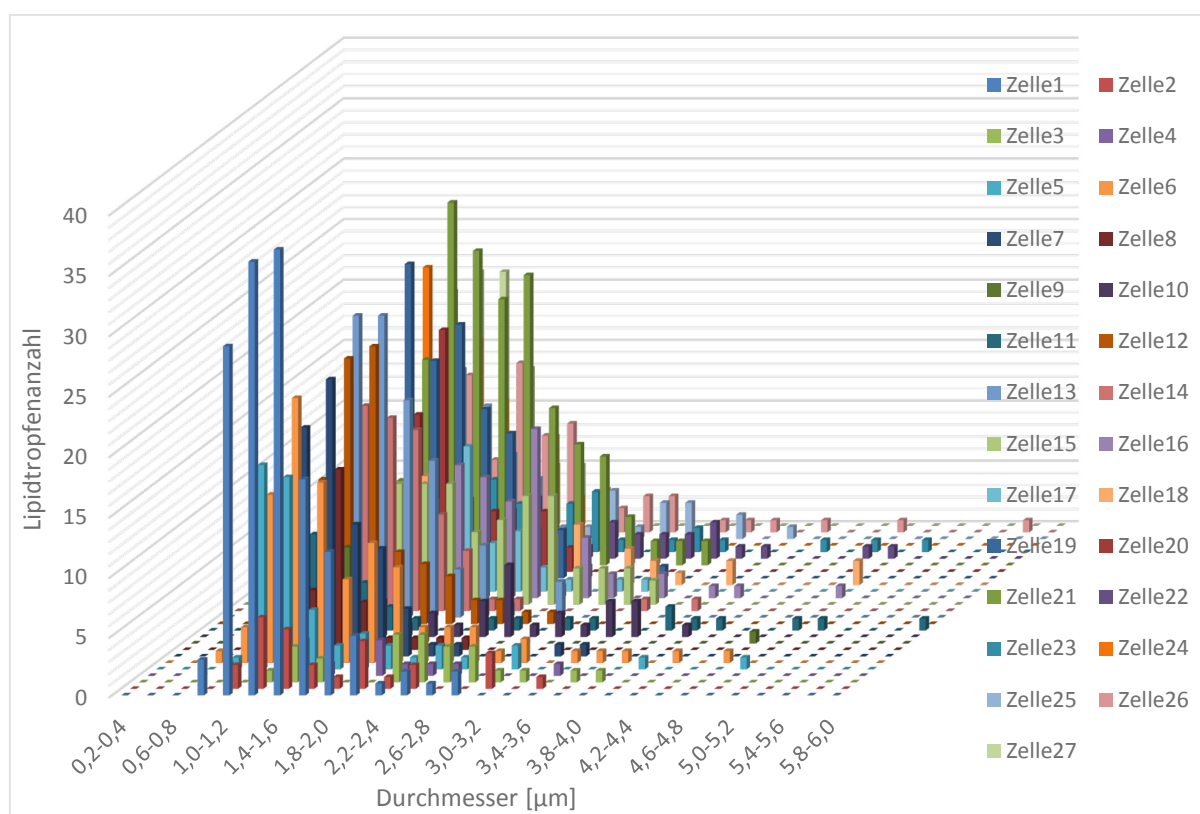


Abbildung 44: Quantifizierung der LD-Größenverteilungen in primären humanen Hepatozyten (Patient 4) nach 24 h Verfettung mit 0,5 mM Ölsäure/Palmitinsäure-Gemisch (1:1).

Tabelle 2: Dichten verschiedener Metabolite

Metabolit	Dichte
MAG	2,571 mmol/L
DAG	1,2855 mmol/L
TAG	1084 mmol/L

9.3 Ratengleichungen und stöchiometrische Matrix des Modells

9.3.1 Die Bindung von Fettsäuren an Albumin

Fettsäuren im Blutplasma sind überwiegend an Plasmaalbumin gebunden und einzig freie Fettsäuren werden über Leber aufgenommen. Die freie Fettsäurekonzentration wird über das Gleichgewicht zwischen freien Fettsäuren und Albumin gebundenen Fettsäuren berechnet. Albumin hat im Modell 5 verschiedene Bindungsstellen für Fettsäuren, die unabhängig von dem Besetzungszustand der anderen Bindungsstellen besetzt werden kann. Folglich besitzt Albumin 32 Besetzungszustände. Das bedeutet, dass der Besetzungszustand ein binärer Vektor der Länge 5 ist (0 nicht besetzt, 1 besetzt).

Folglich gibt es 5 unterschiedliche reversible Elementarprozesse mit folgenden Ratengleichungen:

$$v_{alb_{txxxx}} = V_{max}^{albumin} \cdot \left(alb_{1xxxx} - \frac{1}{K_{eq}^{alb1}} \cdot c16_{ext} \cdot alb_{0xxxx} \right)$$

$$v_{alb_{xtxxx}} = V_{max}^{albumin} \cdot \left(alb_{x1xxx} - \frac{1}{K_{eq}^{alb2}} \cdot c16_{ext} \cdot alb_{x0xxx} \right)$$

$$v_{alb_{xxtxx}} = V_{max}^{albumin} \cdot \left(alb_{xx1xx} - \frac{1}{K_{eq}^{alb3}} \cdot c16_{ext} \cdot alb_{xx0xx} \right)$$

$$v_{alb_{xxxtx}} = V_{max}^{albumin} \cdot \left(alb_{xxx1x} - \frac{1}{K_{eq}^{alb4}} \cdot c16_{ext} \cdot alb_{xxx0x} \right)$$

$$v_{alb_{xxxxt}} = V_{max}^{albumin} \cdot \left(alb_{xxxx1} - \frac{1}{K_{eq}^{alb5}} \cdot c16_{ext} \cdot alb_{xxxx0} \right)$$

$$K_{eq}^{alb1} = 6.2 \cdot 10^4 \text{ [155]}$$

$$K_{eq}^{alb2} = 2.3 \cdot 10^4 \text{ [155]}$$

$$K_{eq}^{alb3} = 1.2 \cdot 10^4 \text{ [155]}$$

$$K_{eq}^{alb4} = 3.1 \cdot 10^3 \text{ [155]}$$

$$K_{eq}^{alb5} = 1.5 \cdot 10^3 [155]$$

Das t bezeichnet die Position, an dem die Fettsäure bindet und wieder freigesetzt wird. Das x kennzeichnet entweder die gebundene oder ungebundene Fettsäure an dieser Position. Jeder Elementarprozess bildet 16 gegenwärtige Bindungsprozesse ab.

$$v_{c16_{ext}} = \sum v_{alb_{xxxxx}}$$

Die Variation der externen Fettsäurekonzentration zwischen 0 und 1.2 mM und das berechnete Gleichgewicht der freien Fettsäurekonzentration ist in Abbildung 45 dargestellt. Es wurde eine fit-Funktion 4. Ordnung benutzt, um die freie Fettsäurekonzentration (FFS) im Blutplasma ($r=1$) von der totalen Fettsäurekonzentration (tfa) zu berechnen.

$$\begin{aligned} \frac{ffa_{plasma}}{[nM]} = & 27.86 \left(\frac{tfa_{plasma}}{[mM]} \right)^4 - 18.29 \left(\frac{tfa_{plasma}}{[mM]} \right)^3 + 30.88 \left(\frac{tfa_{plasma}}{[mM]} \right)^2 \\ & + 17.83 \left(\frac{tfa_{plasma}}{[mM]} \right) \end{aligned}$$

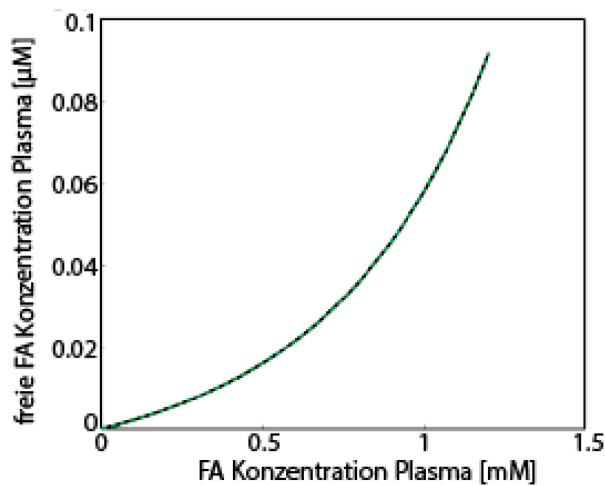


Abbildung 45: Variation der freien Fettsäurekonzentration im Blutplasma von der totalen Fettsäurekonzentration

Eine Plasmakonzentration von 0,5 mM wurde gemäß [135] verwendet.

9.3.2 Die Aufnahme von freien Fettsäuren durch Diffusion und einem aktiven Transportprozess mit CD36

[156, 157]

$$FFA_{ex} \leftrightarrow FFA_{cyt}$$

$$v_{diffusion} = D_{rate} \cdot (FFA_{ex} - FFA_{cyt})$$

$$v_{active\ transport} = v_{max_{active\ transport}} \frac{(FFA_{ex} - FFA_{cyt})}{\left(1 + \frac{FFA_{ex}}{k_{m_{ex}}^{FFA}} + \frac{FFA_{cyt}}{k_{m_{in}}^{FFA}} \right)}$$

$$k_{m_{ex}}^{FFA} = 0.000083 \text{ mM}$$

$$k_{m_{in}}^{FFA} = 0.004 \text{ mM}$$

9.3.3 Die Aktivierung von FFS durch Acyl-CoA-Synthetase

[158]



$$v_{ACS} = v_{max_{ACS}} \cdot \frac{FFA_{cyt}}{(FFA_{cyt} + k_m^{FFA_{cyt}})} \cdot \frac{ATP}{(ATP + k_m^{ATP})} \cdot \frac{CoA_{cyt}}{(CoA_{cyt} + k_m^{CoA_{cyt}})}$$

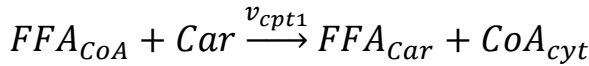
$$K_m^{FFA_{cyt}} = 0.05 \text{ mM}$$

$$K_m^{ATP} = 0.65 \text{ mM}$$

$$k_m^{CoA_{cyt}} = 0.0064 \text{ mM}$$

9.3.4 Die mitochondriale β -Oxidation durch Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1)

[159-162]



$$v_{CPT1} = V_{max}^{CPT1} \cdot \frac{FFA_{cyt}^n \cdot car_{cyt}}{(FFA_{cyt}^n + (K_m^{FFA_{cyt}})^n) \cdot (car_{cyt} + K_m^{c16car_{cyt}})}$$

$$n = 2.47$$

$$K_m^{FFA_{cyt}} = K_0^{FFA_{cyt}} \cdot \left(1 + \frac{malonylcoa_{cyt}}{K_i^{malonylcoa_{cyt}}} \right)$$

$$malonylcoa_{cyt} = 0.0005 \text{ mM}$$

$$car_{cyt} = 0.2 \text{ mM}$$

$$K_m^{Car} = 0.1 \text{ mM}$$

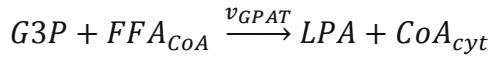
$$K_0^{FFA_{cyt}} = 0.03 \text{ mM}$$

$$K_i^{malonylcoa_{cyt}} = 0.0025 \text{ mM}$$

$$v_{max}^{cpt1} = 0.05$$

9.3.5 Die Triacylglycerolbiosynthese

Veresterung von Glycerin-3-phosphat durch die Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) [163, 164]



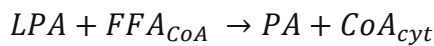
$$v_{GPAT} = v_{max_{GPAT}} \cdot \frac{G3P}{(G3P + k_m^{G3P})} \cdot \frac{FFA_{CoA}}{(FFA_{CoA} + k_m^{FFA_{CoA}})}$$

$$v_{max_{GPAT}} = 0.05$$

$$k_m^{G3P} = 0.2 \text{ mM}$$

$$k_m^{FFA_{CoA}} = 0.09 \text{ mM}$$

Veresterung von Lysophosphatidsäure mit einer aktivierten Fettsäure durch Acylglycerinphosphate-Acyltransferase (AGPAT) [165]



$$v_{AGPAT} = v_{max_{AGPAT}} \cdot \frac{LPA}{(LPA + k_m^{LPA})} \cdot \frac{FFA_{CoA}}{(FFA_{CoA} + k_m^{FFA_{CoA}})}$$

$$v_{max_{AGPAT}} = 0.15$$

$$k_m^{LPA} = 0.0065 \text{ mM}$$

$$k_m^{FFA_{CoA}} = 0.004 \text{ mM}$$

Die Hydrolyse von Phosphatidsäure durch Phosphatidat-Phosphatase (PAP) [166]



$$v_{PAP} = v_{max_{PAP}} \cdot \frac{PA^{n_{PAP}}}{(PA^{n_{PAP}} + k_m^{PAP^{n_{PAP}}})}$$

$$v_{max_{PAP}} = 1$$

$$n_{PAP} = 2.2$$

$$k_m^{PAP} = 0.35 \text{ mM}$$

Synthese von TAG durch DGAT1 [167, 168]

DGAT1 befindet sich in der ER-Membran und synthetisiert TAG_{ER1} , dass für die Synthese von VLDL und die Bildung von „nascent“ LD verwendet wird.



$$v_{TAG_{ER}}^{DGAT1} = v_{\max}^{DGAT1} \cdot \frac{FFA_{CoA}}{(FFA_{CoA} + K_m^{FFA_{CoA}})} \frac{DAG_{ER}}{(DAG_{ER} + K_m^{DAG_{er}})}$$

$$v_{\max}^{DGAT1} = 0.08$$

$$K_m^{FFA_{CoA}} = 0.1 \text{ mM}$$

$$K_m^{DAG_{er}} = 0.03 \text{ mM}$$

Die Synthese von TAG und die Auffüllung von LDs durch DGAT2 [167, 168]

DGAT2 befindet sich entweder in der ER-Membran und synthetisiert TAG_{ER2} , dass für die Bildung von „nascent“ LD verwendet wird oder verteilt sich auf die Oberfläche der LDs, um mit neusynthetisierten TAG TAG_{LD^n} die LD Klasse n direkt aufzufüllen.

$$v_{TAG_{ER2}}^{DGAT2} = v_{\max_{ER}}^{DGAT2} \cdot \frac{FFA_{CoA}}{(FFA_{CoA} + K_m^{FFA_{CoA}})} \frac{DAG_{ER}}{(DAG_{ER} + K_m^{DAG_{er}})}$$

$$v_{TAG_{LD^n}}^{DGAT2} = v_{\max_{LD^n}}^{DGAT2} \cdot \frac{FFA_{CoA}}{(FFA_{CoA} + K_m^{FFA_{CoA}})} \frac{DAG_{ER}}{(DAG_{ER} + K_m^{DAG_{er}})}$$

$$K_m^{DAG_{er}} = 0.084$$

$$K_m^{FFA_{CoA}} = 0.1$$

Die Verteilung von DGAT2 zwischen dem ER und der unterschiedlichen LD Klassen LD^n hängen von der LD Anzahl in jeder Fraktion num_{LD^n} und dem Radius r_{ld} von den LDs ab.

$$K_{LD^n}^{dgat2} = num_{LD^n} \cdot \left(1 - \frac{r_{ld}^n}{r_{ld}^n + k_{r_{ld}}^n}\right)$$

$$n = 3$$

$$k_{r_{ld}}^n = 0.15 \text{ } \mu\text{m}$$

$$K_{er}^{dgat2} = \frac{10}{\sum_{n=1}^{LD_{\max}} num_{LD^n}}$$

$$v_{\max_{ER}}^{DGAT2} = v_{\max}^{DGAT2} \cdot \frac{K_{er}^{dgat2}}{K_{er}^{dgat2} + \sum_{n=1}^{LD_{\max}} K_{LD^n}^{dgat2}}$$

$$v_{\max_{LD^n}}^{DGAT2} = v_{\max}^{DGAT2} \cdot \frac{K_{LD^n}^{dgat2}}{K_{er}^{dgat2} + \sum_{n=1}^{LD_{\max}} K_{LD^n}^{dgat2}}$$

Das Auffüllen von den LD Klassen n verringert den zellulären TAG-Gehalt TAG_{LD^n} in der betreffenden LD Klasse und erhöht gleichzeitig den zellulären TAG-Gehalt $TAG_{LD^{n+1}}$ in LD Klasse n+1 durch das Verlagern von TAG_{LD^n} zu $TAG_{LD^{n+1}}$. Die Verlagerungsrate hängt von dem relativen Volumen ΔVol_{LD^n} zwischen Klasse n und Klasse n+1 ab.

$$v_{shift_{LD^n}}^{DGAT2} = v_{TAG_{LD^n}}^{DAGT2} \cdot \Delta Vol_{LD^n}$$

$$\Delta Vol_{LD^n} = \frac{Vol_{LD^n}}{Vol_{LD^{n-1}}} - 1$$

Die Änderung von TAG_{LD^n} ist die Summe der aufgefüllten Klassen begleitet durch das Verschieben von TAG von der Klasse und die nächsthöhere Klasse.

$$v_{TAG_{LD^n}}^{fill_{DGAT2}} = v_{TAG_{LD^{n-1}}}^{DAGT2} + v_{shift_{LD^n}}^{DGAT2} - v_{shift_{LD^{n+1}}}^{DGAT2}$$

9.3.6 Die Synthese von Lipidtropfen (ohne Proteinbesatz)

Den „nascent“ Lipidtropfen, TAG_{nLD} , haben keine Oberflächenproteine und werden vom TAG aus der ER-Membran synthetisiert.

$$TAG_{ER1/2} \xrightarrow{v_{LD}^{de novo}} LD_{nLD}$$

$$v_{LD_1}^{de novo} = v_{\max_{LD_1}}^{de novo} \cdot tag_{ER1}$$

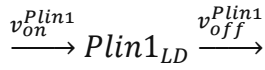
$$v_{\max_{LD_1}}^{de novo} = 1$$

$$v_{LD_2}^{de novo} = v_{\max_{LD_2}}^{de novo} \cdot tag_{ER2}$$

$$v_{\max_{LD_2}}^{de novo} = 1$$

9.3.7 Die regulatorischen Oberflächenproteine (ROPs)

Perilipin (Plin1)



Plin1 bindet reversible an große LDs. Die Bindung hängt vom LD Radius und der Fraktion der freien Plätze auf der LD Oberfläche f_{LD}^{free} ab.

$$v_{on}^{Plin1} = k_{on}^{Plin1} \cdot k_r^{Plin1} \cdot Plin1_{cyt} \cdot f_{LD}^{free}$$

$$v_{off}^{Plin1} = (1 - k_r^{Plin1}) \cdot Plin1_{LD}$$

$$k_{on}^{Plin1} = 5$$

$$k_r^{Plin1} = \frac{r_{LD}^n}{r_{LD}^n + k_{r_{ld}}^n}$$

$$k_{r_{ld}} = 2 \mu m$$

$$n = 15$$

ADRP (Perilipin 2)



ADRP bindet reversible an mittelgroße LD. Die Bindung hängt vom LD Radius und der Fraktion der freien Plätze auf der LD Oberfläche f_{LD}^{free} ab.

$$v_{on}^{ADRP} = k_{on}^{ADRP} \cdot (1 - k_r^{ADRP}) \cdot ADRP_{cyt} \cdot f_{LD}^{free}$$

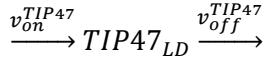
$$v_{off}^{ADRP} = ADRP_{LD}$$

$$k_r^{ADRP} = \frac{r_{LD}^n}{r_{LD}^n + k_{r_{ld}}^n}$$

$$k_{r_{ld}} = 2 \mu m$$

$$n = 12$$

$$k_{on}^{ADRP} = 35$$

Tip47 (Perilipin 3)

Tip47 bindet vorwiegend kleine LDs. Die Bindung hängt vom LD Radius und der Fraktion der freien Plätze auf der LD Oberfläche f_{LD}^{free} ab.

$$v_{on}^{TIP47} = TIP_{cyt} \cdot f_{LD}^{free} \cdot k_r^{TIP47}$$

$$v_{off}^{Plin3} = (1 - k_r^{TIP47}) \cdot TIP47_{LD}$$

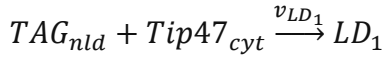
$$k_r^{TIP47} = \left(1 - \frac{r_{LD}^n}{r_{LD}^n + k_{r_{ld}}^n} \right)$$

$$k_{r_{ld}} = 0.5 \mu m$$

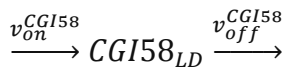
$$n = 10$$

Die Bindung von Tip47 auf die Oberfläche von „nascent“ LDs

Die „nascent“ Lipidtröpfchen werden von Tip47 auf der LD Oberfläche gebunden.



$$v_{LD1} = TAG_{nLD} \cdot Tip47_{cyt}$$

Die Bindung von CGI58 an LD

$$v_{on}^{CGI58} = k_{on}^{CGI58} \cdot CGI58_{cyt} \cdot (k_1 \cdot Pln_{LD} + k_2 \cdot ADFP_{LD})$$

$$v_{off}^{CGI58} = k_{off}^{CGI58} \cdot CGI58_{LD}$$

$$k_{on}^{CGI58} = 0.1$$

$$k_{off}^{CGI58} = 1$$

$$k_1 = 0.1$$

$$k_2 = 0.2$$

Die Bindung von ATGL an LD

ATGL bindet die Fraktion der leeren Plätze an der LD Oberfläche (f_{LD}^{free}). Durch die Phosphorylierung (γ) von CGI58 aufgrund hormoneller Stimulation bindet CGI-58 die ATGL und aktiviert diese.

$$v_{ATGL_{LD}}^{on} = k_{ATGL_{LD}}^{on} \cdot num_{LD} \cdot Sur_{LD} \cdot f_{LD}^{free} \cdot ATGL_{cyt}$$

$$v_{ATGL_{LD}}^{off} = k_{ATGL_{LD}}^{off} \cdot ATGL_{LD}$$

$$k_{ATGL_{LD}}^{on} = 0.001$$

$$k_{ATGL_{LD}}^{off} = 0.01$$

$$v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} = k_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} \cdot num_{LD} \cdot Sur_{LD} \cdot (CGI58_{LD} \cdot (1 - \gamma)) \cdot ATGL_{LD}$$

$$v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off} = k_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off} \cdot ATGL_{LD}^{CGI58}$$

$$k_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} = 0.001$$

$$k_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off} = 0.01$$

9.3.8 Die Degradation von LDs

Die Lipidtropfen Degradation durch die adipozyten Triglyzeridlipase (ATGL)



Im ersten Schritt kann die ATGL TAG im LD hydrolysieren.

$$v_{ATGL_{LD}} = v_{max}^{ATGL} \cdot num_{LD} \cdot (ATGL_{LD} + 20 \cdot ATGL_{LD}^{CGI58}) \cdot TAG_{LD}$$

$$v_{ATGL}^{TAG_{nld}} = TAG_{nld} \cdot ATGL_{cyt}$$

$$v_{max}^{ATGL} = 0.0022$$

Die Lipidtropfen Degradation durch die hormonsensitive Lipase (HSL)



Die HSL kann TAG hydrolysieren, dennoch spaltet die HSL überwiegend DAG. Die HSL wird durch die Phosphorylierung von $ADRP_{LD} + Plin1_{LD}$ aktiviert.

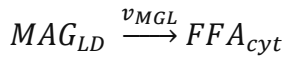
$$v_{HSL}^{TAG} = v_{\max_{TAG}}^{HSL} \cdot (1 - \gamma) \cdot num_{LD} \cdot Sur_{LD} \cdot (f_{LD}^{free} + ADRP_{LD} + Plin1_{LD}) \cdot \frac{TAG_{LD}}{TAG_{LD} + DAG_{LD} + MAG_{LD}}$$

$$v_{HSL}^{DAG} = v_{\max_{DAG}}^{HSL} \cdot (1 - \gamma) \cdot num_{LD} \cdot Sur_{LD} \cdot (f_{LD}^{free} + ADRP_{LD} + Plin1_{LD}) \cdot \frac{DAG_{LD}}{TAG_{LD} + DAG_{LD} + MAG_{LD}}$$

$$v_{\max_{TAG}}^{HSL} = 0.0000015$$

$$v_{\max_{DAG}}^{HSL} = 0.0015$$

Die Hydrolyse von Monoacylglycerin durch die Monoacylglycerin-Lipase (MGL)



Der letzte Schritt der LD TAG-Degradation wird durch MGL hydrolysiert

$$v_{MGL} = v_{\max_{MAG}}^{MGL} \cdot num_{LD} \cdot Sur_{LD} \cdot \frac{MAG_{LD}}{(TAG_{LD} + DAG_{LD} + MAG_{LD})}$$

$$v_{\max_{MAG}}^{MGL} = 1$$

9.3.9 Die Fusion von Lipidtropfen

Die Fusion von Lipidtropfen durch fsp27 reguliert. Die Fusionsrate fr_{ij} zwischen LDs der Größe i und j hängt von den Radien der zwei fusionierenden LDs ab: Je größer die Größendifferenz je schneller die Fusionsrate. LDs mit maximaler Größe (\max_{LD}) können nicht fusionieren.

$$fr_{ij} = k_{fus} \cdot fsp27 \cdot num_{LD^i} \cdot num_{LD^j} \cdot \left(\frac{1}{|r_{LD^i} - r_{LD^j}|} \right)$$

Die Fusion von LDs der Klasse i und j mit $i > j$ verringern den zellulären TAG-Gehalt TAG_{LD^i} und TAG_{LD^j} in der betreffenden Klasse und erhöhen den zellulären TAG-Gehalt der $TAG_{LD^{j+1}}$. TAG_{LD^j} wird mit TAG_{LD^i} aufgefüllt. Analog zum LD-Auffüllen wird TAG von TAG_{LD^j} zu $TAG_{LD^{j+1}}$ verschoben. Die Verlagerungsrate hängt vom relativen Volumen ΔVol_{LD^j} zwischen Klasse j und Klasse j+1 ab.

$$v_{TAG_{LD^j}}^{fus_{shrink}} = \sum_{i=j}^{\max_{LD}-1} fr_{ij} \cdot Vol_{LD^j}$$

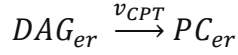
$$v_{shift_{LD^j}}^{fus_{shrink}} = v_{TAG_{LD^j}}^{fus_{shrink}} \cdot \Delta Vol_{LD^j}$$

$$v_{TAG_{LDj}}^{fus_{growth}} = \sum_{i=1}^{j-1} fr_{ij} \cdot Vol_{LDi}$$

$$v_{shift_{LDj}}^{fus_{growth}} = v_{TAG_{LDj}}^{fus_{growth}} \cdot \Delta Vol_{LDj}$$

$$v_{Tag_{LDj}}^{fus} = v_{TAG_{LDj}}^{fus_{growth}} - v_{TAG_{LDj}}^{fus_{shrink}} + v_{shift_{LDj}}^{fus} - v_{shift_{LDj+1}}^{fus}$$

9.3.10 Phospholipidsynthese durch Cholin-Phosphotransferase (CPT)



$$v_{CPT} = v_{max_{CPT}} \cdot \frac{DAG_{er}}{(DAG_{er} + K_m^{DAG})}$$

$$v_{max_{CPT}} = 1$$

$$K_m^{DAG} = 0.15 \text{ mM}$$

$$v_{pcTrans} = v_{max_{pcTrans}} \cdot PC_{ER}$$

$$v_{max_{pcTrans}} = 1$$

9.3.11 Die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen

Synthese und Degradation von ApoB [100]



Die Degradation von ApoB ist die Summe der basalen und insulinabhängigen Degradationsraten.

$$v_{ApoB}^{syn} = 1$$

$$v_{ApoB}^{deg} = v_{max_{ApoB}}^{deg} \cdot ApoB \cdot k_b + k_{ins} \cdot \frac{ins_{ext}}{ins_{ext} + K_a^{apoB_{deg}}}$$

$$v_{max_{ApoB}}^{deg} = 8$$

$$K_a^{apoB_{deg}} = 10000 \text{ pM}$$

$$k_b = 0.3$$

$$k_{ins} = 0.7$$

Synthese und Sekretion von VLDL

Die Lipoprotein (VLDL) werden durch den MTP vermittelten Transfer von TAG vom ER zu ApoB synthetisiert.

$$TAG_{ER1} \rightarrow TAG_{VLDL}$$

$$v_{MTP} = v_{max_{MTP}} \cdot TAG_{ER} \cdot apoB$$

$$v_{max_{MTP}} = 0.003$$

$$TAG_{VLDL} \rightarrow VLDL_{ex}$$

$$v_{VLDL_{ex}} = v_{max_{VLDL_{ex}}} \cdot \frac{TAG_{VLDL}}{TAG_{VLDL} + K_m^{TAG_{VLDL}}}$$

$$v_{max_{VLDL_{ex}}} = 10$$

$$K_m^{TAG_{VLDL}} = 10 \text{ mM}$$

9.3.12 Stöchiometrische Matrix

$$\begin{aligned} \frac{d FA_{cyt}}{dt} = & v_{active\ transport} + v_{diffusion} - v_{ACS} + \sum v_{HSL}^{TAG} + \sum v_{ATGL} + \sum v_{HSL}^{DAG} \\ & + \sum v_{MGL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d FA_{CoA}}{dt} = & v_{ACS} - v_{GPAT} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} - v_{AGPAT} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} - v_{CPT1} - \left(\sum v_{TAG_{LD}^n}^{DGAT2} \right) - v_{TAG_{ER2}}^{DGAT2} \\ & \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} - v_{TAG_{ER}}^{DGAT1} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d Co_{cyt}}{dt} = & v_{GPAT} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} + v_{AGPAT} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} - v_{ACS} + v_{CPT1} + \left(\sum v_{TAG_{LD}^n}^{DGAT2} \right) + v_{TAG_{ER2}}^{DGAT2} \\ & \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} + v_{TAG_{ER}}^{DGAT1} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} \end{aligned}$$

$$\frac{d ATP_{cyt}}{dt} = -v_{ACS} - v_{kinase}^{Glycerol}$$

$$\frac{d ADP_{cyt}}{dt} = v_{kinase}^{Glycerol}$$

$$\frac{d AMP_{cyt}}{dt} = v_{ACS}$$

$$\frac{d ppi_{cyt}}{dt} = v_{ACS}$$

$$\frac{d Pi_{cyt}}{dt} = v_{PAP} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}}$$

$$\frac{d PC_{ER}}{dt} = v_{CPT} - v_{pcTrans}$$

$$\frac{d G3P_{cyt}}{dt} = v_{kinase}^{Glycerol} - v_{GPAT} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}}$$

$$\frac{d Glyc_{cyt}}{dt} = v_{uptake}^{Glycerol} - v_{kinase}^{Glycerol} + \sum v_{MGL}$$

$$\frac{d LPA}{dt} = v_{GPAT} - v_{AGPAT}$$

$$\frac{d PA}{dt} = -v_{PAP} + v_{AGPAT}$$

$$\frac{d MAG_{cyt}}{dt} = \sum v_{HSL} - v_{MGL}$$

$$\frac{d DAG_{ER}}{dt} = v_{PAP} - v_{CPT} - \left(\sum v_{TAG_{LD}^n}^{DGAT2} \right) \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} - v_{TAG_{ER}^2}^{DGAT2} - v_{TAG_{ER}}^{DGAT1}$$

$$\frac{d DAG_{LD}}{dt} = v_{ATGL} + v_{HSL}^{TAG} - v_{HSL}^{DAG}$$

$$\frac{d MAG_{LD}}{dt} = v_{HSL}^{DAG} - v_{MGL}$$

$$\frac{d TAG_{ER2}}{dt} = v_{TAG_{ER}^2}^{DGAT2} - \sum \left(v_{LD_2}^{de novo} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} \right)$$

$$\frac{d TAG_{ER1}}{dt} = -v_{MTP} - \sum \left(v_{LD_1}^{de novo} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{cell}} \right) + v_{TAG_{ER}}^{DGAT1}$$

$$\frac{d TAG_{LD}}{dt} = v_{TAG_{LD}^n}^{fill_{DGAT2}} - v_{ATGL} - v_{HSL}^{TAG} + v_{LD_{fusion}}$$

$$\frac{d TAG_{nld}}{dt} = v_{LD_1}^{de novo} + v_{LD_2}^{de novo} - \sum v_{LD_1} - v_{ATGL_{TAG}}^{nld}$$

$$\frac{d TAG_{VLDL}}{dt} = v_{MTP} \cdot \frac{Vol_{ER}}{Vol_{VLDL}} - v_{VLDL_{ex}}$$

$$\frac{d ApoB}{dt} = v_{ApoB}^{syn} - v_{ApoB}^{deg} - v_{MTP}$$

$$Vol_{cyt} = 2,81 * 10^{-12} L$$

$$Vol_{ER} = 2,1 * 10^{-12} L$$

$$\frac{dPlin0_{LD}}{dt} = -\frac{dPlin1_{LD}}{dt} - \frac{dPlin2_{LD}}{dt} - \frac{dPlin3_{LD}}{dt} - \frac{dATGL_{LD0}}{dt}$$

$$\frac{dPlin1_{LD}}{dt} = v_{on}^{Plin1} - v_{off}^{Plin1}$$

$$\frac{dPlin2_{LD}}{dt} = v_{on}^{Plin2} - v_{off}^{Plin2}$$

$$\frac{dPlin3_{LD}}{dt} = v_{on}^{Plin3} - v_{off}^{Plin3}$$

$$\frac{dCGI58_{LD}}{dt} = v_{on}^{CGI58} - v_{off}^{CGI58} - v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} + v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off}$$

$$\frac{dCGI58_{LD}^{ATGL}}{dt} = v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} - v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off}$$

$$\frac{dATGL_{LD0}}{dt} = v_{ATGL_{LD0}}^{on} - v_{ATGL_{LD0}}^{off} - v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} + v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off}$$

$$\frac{dATGL_{LD\ CGI58}}{dt} = v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ on} - v_{ATGL_{LD}}^{CGI58\ off}$$

$$\frac{dPlin0_{LD}}{dt} = -Plin3_{LD} - Plin2_{LD} - Plin1_{LD} - ATGL_{LD0}$$

9.4 Modellsimulationen

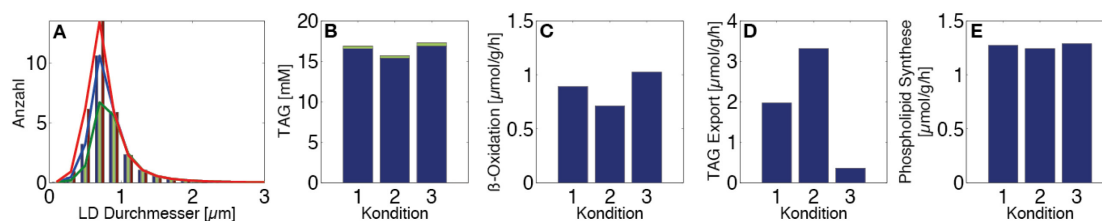


Abbildung 46: Überexpression und Knockdown von MTP im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: MTP Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: MTP-Knockdown: 0,1-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

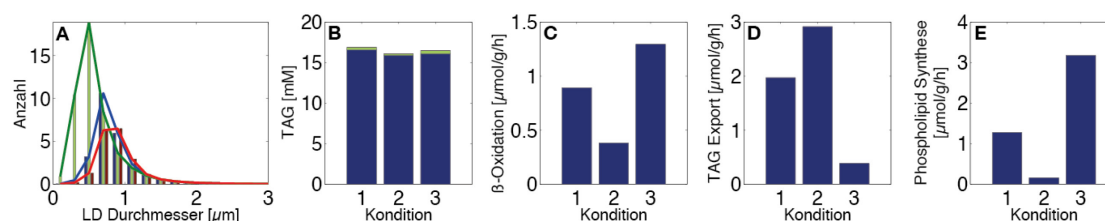


Abbildung 47: Überexpression und Knockdown von DGAT1 im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: DGAT1 Überexpression: 8-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: DGAT1 Knockdown: 0.125-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

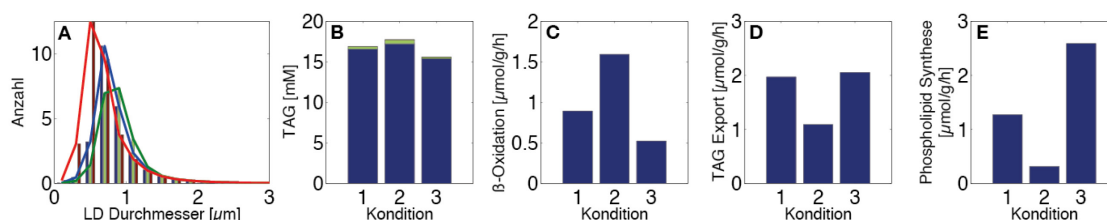


Abbildung 48: Überexpression und Knockdown von DGAT2 im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: DGAT2 Überexpression: 4-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: DGAT2 Knockdown: 0.25-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

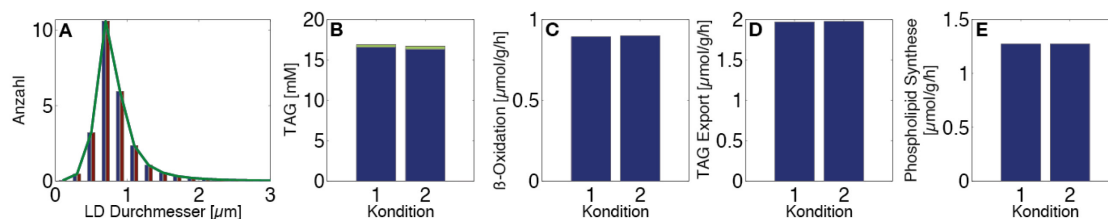


Abbildung 49: Knockdown von Perilipin im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: Perilipin Knockdown: Reduzierung Proteinmenge um Faktor null (grüne Kurve in A).

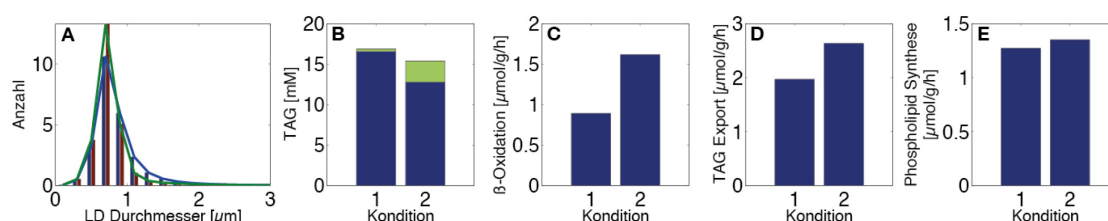


Abbildung 50: Knockdown von ADRP im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: ADRP Knockdown: Reduzierung Proteinmenge um Faktor null (grüne Kurve in A).

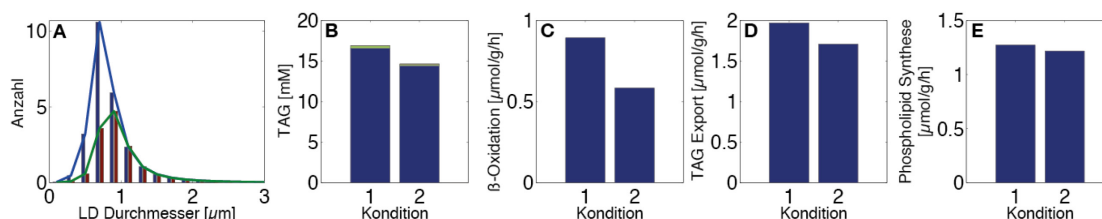


Abbildung 51: Knockdown von TIP47 im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: TIP47 Knockdown: Reduzierung der Proteinmenge um Faktor 0.1 (grüne Kurve in A).

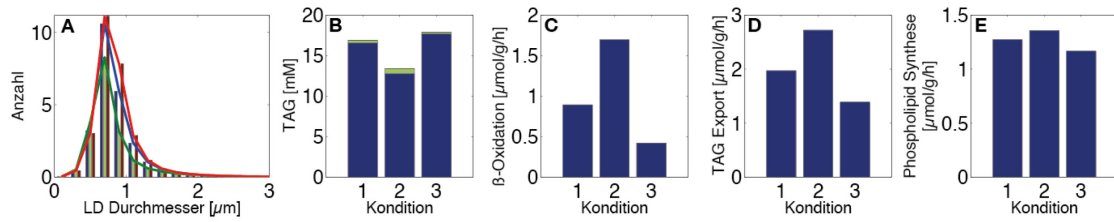


Abbildung 52: Überexpression und Knockdown von CGI-58 im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: CGI-58 Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: CGI-58 Knockdown: 0-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

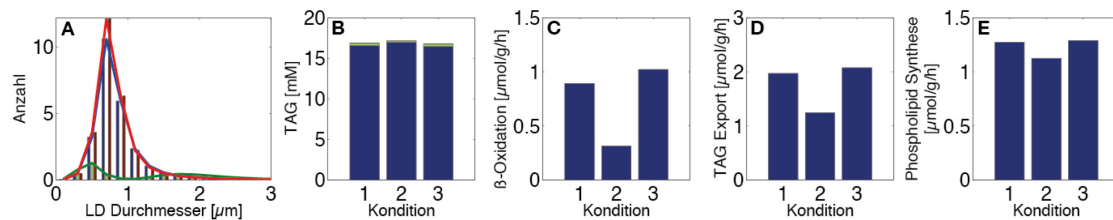


Abbildung 53: Überexpression und Knockdown von FSP27 im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: FSP27 Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: FSP27 Knockdown: 0.1-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

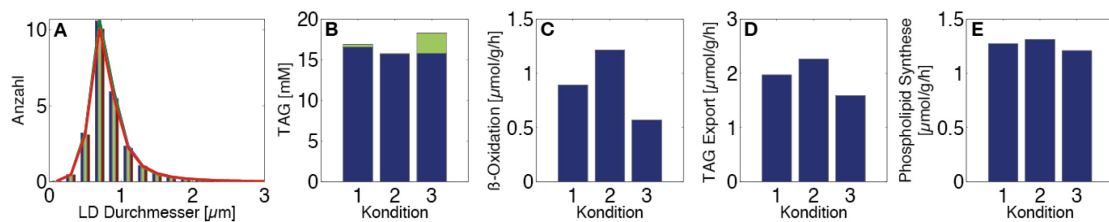


Abbildung 54: Überexpression und Knockdown der hormon-sensitiven Lipase im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung, B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: HSL Überexpression: 10-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: MTP-Knockdown: 10-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

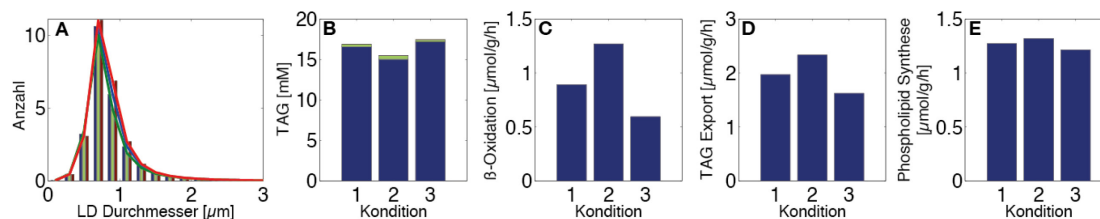


Abbildung 55: Überexpression und Knockdown der ATGL im transienten Zustand (1h). A: LD-Größenverteilung,

B: zellulärer TAG-Gehalt, C: die Rate der β -Oxidation, D: die Rate des TAG-Exports, E: die Rate der Phospholipidsynthese, Kondition 1: Standard Häufigkeitsverteilung (blaue Kurve in A); Kondition 2: ATGL Überexpression: 2-fache Erhöhung der Proteinmenge (grüne Kurve in A); Kondition 3: ATGL-Knockdown: 0,5-fache Reduktion der Proteinmenge (rote Kurve in A).

Tabelle 3: Externe Bedingungen von stationären und transienten Simulationen

Experiment	Plasma Fettsäure	Insulin [pM]	Glukagon [mM]
DGAT1	0,478	1514	70
DGAT2	0,478	1514	70
MTP	0,478	1514	70
ATGL	0,478	1514	70
HSL	0,478	1514	70
CGI-58	0,478	1514	70
FSP27	0,478	1514	70
ADRP	0,478	1514	70
TIP47	0,478	1514	70
Perilipin	0,478	1514	70

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation

Die Verfettungsexperimente mit primären humanen Hepatozyten wurden von Theresa Schulz im Labor von Dr. Georg Damm (Charité) durchgeführt.

Unter meiner Anleitung hat Dimitra Eleftheriadou einen Teil der Daten der Verfettungsexperimente von primären humanen mit der NIS-Elements-Software quantifiziert.

Die Arbeiten zu den Verfettungsexperimenten mit PLC-Zellen habe ich in selbstständig geplant und in Zusammenarbeit mit Nishika Sahini im Labor von Prof. Jürgen Borlak durchgeführt.

Das Modell wurde mit Unterstützung von Dr. Nikolaus Berndt entwickelt und implementiert.

Danksagung

Besonders danke ich Prof. Dr. Holzhütter für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit am Institut für Biochemie der Charité Berlin, die Betreuung und die hilfreichen Anregungen.

Frau Prof. Dr. Dr. Klipp danke ich für das Interesse und die Unterstützung dieser Dissertation sowie die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Seehofer danke ich für das Interesse und die Bereitschaft für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Herrmann und Dr. Marcus Krantz danke ich für Bereitschaft, als Prüfer dieser Dissertation zu agieren.

Dr. Nikolaus Berndt danke ich für die stets professionelle und verfügbare Betreuung.

Dimitra Eleftheriadou danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der sehr umfangreichen detaillierten Quantifizierung der Daten aus den Verfettungsexperimenten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Kollegen Johannes Eckstein und Sascha Bulik bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die beigelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigelegte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 6. Juli 2009. Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberaterinnen/Promotionsberater stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Berlin, 06. Oktober 2016